



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ROSIANE NICKEL

AVALIAÇÃO DA ÁGUA BORICADA PARA
APLICAÇÕES OFTALMOLÓGICAS

MESTRADO EM
TECNOLOGIA EM SAÚDE
PUCPR

PUCPR

CURITIBA
2005

ROSIANE NICKEL

**AVALIAÇÃO DA ÁGUA BORICADA PARA APLICAÇÕES
OFTALMOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Saúde da PUCPR como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

CURITIBA

2005

ROSIANE NICKEL

**AVALIAÇÃO DA ÁGUA BORICADA PARA APLICAÇÕES
OFTALMOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Saúde da PUCPR como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Percy Nohama

Banca Examinadora:

Orientador e Presidente da banca:
Prof. Dr. Percy Nohama

Examinadores:
Prof. Dr. Márcio Labastie – FIOCRUZ/ INCQS
Prof. Dr. Joaquim Miguel Maia – CEFETPR
Profa. Dra. Elisangela Ferretti Manffra – PUCPR

**CURITIBA
2005**

Nickel, Rosiane
N632a Avaliação da água boricada para aplicações oftalmológicas / Rosiane
2005 Nickel ; orientador, Percy Nohama. -- 2005.
xiv, 152 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2005
Inclui bibliografia

1. Ácido bórico. 2. Oftalmologia. 3. Medicamentos – Efeitos colaterais.
I. Nohama, Percy. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa
de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde. III. Título.

CDD 20.ed. -- 615.19
617.7
615.1

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Percy Nohama, pelos ensinamentos, sugestões amizade e parceria no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga e Professora Wanda Moscalewski Abrahão, pelo apoio e auxílio para a realização deste trabalho.

À grande amiga Marisa de Moura Souza Luz, pelos ensinamentos que muito contribuíram para o desenvolvimento dos ensaios microbiológicos.

À amiga de todas as horas, Niza Helena de Almeida, pelas idéias, contribuição profissional e companheirismo.

Aos meus pais, que me apoiaram e compreenderam os momentos de minha ausência.

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná, pela colaboração para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.3 JUSTIFICATIVA	4
1.4 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	5
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO OLHO	7
2.2 DOENÇAS OCULARES	10
2.3 ÁGUA BORICADA	16
2.4 ÁCIDO BÓRICO	17
2.5 PREPARAÇÕES OFTÁLMICAS	24
2.5.1 Esterilidade	26
2.5.2 Conservantes	28
2.5.3 pH	33
2.5.4 Contaminação Microbiana	35
2.5.5 Embalagens para as Preparações Oftálmicas	38
2.5.6 Rotulagem	40
2.6 MICRORGANISMOS	41
2.6.1 <i>Salmonella</i>	42
2.6.2 Estafilococos	42
2.6.3 <i>Pseudomonas</i>	44
2.6.4 <i>Bacillus subtilis</i>	48
2.6.5 Fungos	48
2.7 METODOLOGIA	51

2.7.1	Condições Microbiológicas	51
2.7.1.1	Contagem de viáveis totais	51
2.7.1.2	Pesquisa de patógenos	54
2.7.2	Parâmetros Físico-Químicos	56
2.7.2.1	Aspecto	56
2.7.2.2	Determinação de pH	56
2.7.2.3	Teor de ácido bórico	57
2.7.3	Teste de Eficácia Antimicrobiana	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1	PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO	59
3.1.1	Protocolo de Investigação Aplicado à População.....	59
3.1.2	Protocolo de Investigação Aplicado nas Farmácias e Drogarias	60
3.2	AMOSTRAS	61
3.3	EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS	63
3.3.1	Ensaio Físico-Químicos	64
3.3.2	Ensaio Microbiológicos	64
3.4	REAGENTES E SOLUÇÕES	66
3.5	MICROORGANISMOS DE REFERÊNCIA	66
3.6	MEIOS DE CULTURA	66
3.7	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NAS AMOSTRAS	67
3.7.1	Avaliação da Embalagem	68
3.7.2	Avaliação da Rotulagem	68
3.7.3	Ensaio Microbiológicos	68
3.7.3.1	Verificação da capacidade inibitória	69
3.7.3.2	Contagem de viáveis totais	70
3.7.3.3	Pesquisa de patógenos	72
3.7.4	Ensaio físico-químicos	73
3.7.4.1	Aspecto	73
3.7.4.2	Determinação do pH	74
3.7.4.3	Teor de ácido bórico	74
3.8	TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	75

3.8.1	Preparo do Inóculo	76
3.8.2	Procedimento	77
3.8.3	Expressão dos resultados da análise	79
3.8.4	Critério para a eficácia antimicrobiana	80
4	RESULTADOS	81
4.1	PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO	81
4.1.1	Protocolo de Investigação Aplicado à População	81
4.1.2	Protocolo de Investigação Aplicado nas Farmácias e Drogarias ..	87
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NAS AMOSTRAS	92
4.2.1	Avaliação da Embalagem	93
4.2.2	Avaliação da Rotulagem	94
4.2.2.1	Formulação	94
4.2.2.2	Prazo de validade	96
4.2.2.3	Indicações de uso e outras informações	97
4.2.3	Ensaio Microbiológicos	98
4.2.3.1	Contagem de viáveis totais	98
4.2.3.2	Pesquisa de patógenos	100
4.2.4	Ensaio Físico-Químicos	100
4.2.4.1	Aspecto	100
4.2.4.2	Determinação do pH	100
4.2.4.3	Teor de ácido bórico	101
4.3	TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	101
5	DISCUSSÃO	111
5.1	PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO	111
5.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	112
5.2.1	Avaliação da Embalagem e Rótulo	112
5.2.2	Análise Microbiológica	117
5.2.3	Ensaio Físico-químicos	120
5.3	EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	121
5.4	AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS COM OS RESULTADOS DO TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA	122

6 CONCLUSÕES	125
6.1 TRABALHOS FUTUROS	127
REFERÊNCIAS	129
ANEXOS	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do olho humano	7
Figura 2.	Fotografia de olho afetado por conjuntivite bacteriana, mostrando a dilatação dos vasos.....	12
Figura 3.	Fotomicrografia de <i>A.niger</i> , colorido com eosina e hematoxilina	49
Figura 4.	Distribuição dos fabricantes de Água Boricada em alguns Estados do Brasil.....	62
Figura 5.	Fotografia das amostras de Água Boricada produzidas em laboratório	76
Figura 6.	Esquema de fracionamento das amostras de Água Boricada produzidas em laboratório	78
Figura 7.	Fotografia do fluxo laminar contendo material para a execução do teste de eficácia antimicrobiana	78
Figura 8.	Esquema de diluição das amostras e distribuição nas placas para o teste de eficácia antimicrobiana	79
Figura 9.	Distribuição proporcional do sexo da população entrevistada	81
Figura 10.	Distribuição proporcional da naturalidade dos entrevistados	82
Figura 11.	Faixa etária da população entrevistada	82
Figura 12.	Grau de escolaridade dos entrevistados	83
Figura 13.	Frequência das respostas de conhecimento e uso da Água Boricada	83
Figura 14.	Distribuição proporcional do conhecimento do uso da Água Boricada	84
Figura 15.	Distribuição proporcional da utilização da Água Boricada	85
Figura 16.	Distribuição proporcional da forma de utilização da Água Boricada	85
Figura 17.	Distribuição proporcional do local de aplicação da Água Boricada ..	86
Figura 18.	Frequência da forma de aquisição da Água Boricada	86
Figura 19.	Frequência da obtenção do resultado esperado com o uso da Água Boricada	87
Figura 20.	Distribuição dos estabelecimentos pesquisados na Cidade de Curitiba	88

Figura 21.	Frequência da caracterização das farmácias e drogarias entrevistadas.....	89
Figura 22.	Frequência da função no estabelecimento de quem respondeu ao questionário	89
Figura 23.	Frequência dos estabelecimentos que vendem Água Boricada da mesma marca	90
Figura 24.	Frequência dos motivos das farmácias e drogarias para comprar Água Boricada sempre da mesma marca.....	90
Figura 25.	Frequência dos motivos expostos pelos estabelecimentos para não efetuar a compra da Água Boricada sempre da mesma marca	91
Figura 26.	Frequência do motivo das vendas do produto nos estabelecimentos	92
Figura 27.	Distribuição proporcional dos fatores que influenciam na venda da Água Boricada	92
Figura 28.	Prazo de validade das amostras de Água Boricada	96
Figura 29.	Fotografia da contagem de bolores e leveduras na amostra 34	98
Figura 30.	Fotografia do resultado do teste de eficácia antimicrobiana aos 14 dias, para a cepa de <i>C. albicans</i> nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório	103
Figura 31.	Fotografia do resultado do teste de eficácia antimicrobiana aos 28 dias, para a cepa de <i>A. niger</i> nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório	104
Figura 32.	Fotografia do resultado do teste de eficácia antimicrobiana aos 14 dias, para as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório	104
Figura 33.	Redução do crescimento das cepas de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> (em número de log) nas amostras de Água Boricada produzidas no laboratório e contaminadas artificialmente	105
Figura 34.	Redução do crescimento das cepas de <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> e <i>B. subtilis</i> (em número de log) nas amostras de Água Boricada produzidas no laboratório e contaminadas artificialmente	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Modelo do protocolo de investigação aplicado à população	60
Tabela 2.	Modelo do protocolo de investigação aplicado em farmácias e drogarias	61
Tabela 3.	Relação dos fabricantes de Água Boricada, Estados e amostras	63
Tabela 4.	Relação dos equipamentos e instrumentos utilizados nos ensaios físico-químicos	64
Tabela 5.	Relação dos equipamentos e instrumentos utilizados nos ensaios microbiológicos	65
Tabela 6.	Relação dos reagentes e soluções utilizados nos ensaios analíticos	66
Tabela 7.	Relação dos meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos	67
Tabela 8.	Características das amostras de Água Boricada produzidas em laboratório	75
Tabela 9.	Requisitos para reativação dos microrganismos	77
Tabela 10.	Critérios para a eficácia antimicrobiana	80
Tabela 11.	Tipos de frascos das amostras de Água Boricada	93
Tabela 12.	Volume nominal declarado das amostras	94
Tabela 13.	Formulação das amostras de Água Boricada	95
Tabela 14.	Prazos de validade das amostras de Água Boricada	96
Tabela 15.	Resultados da contagem de viáveis totais nas amostras de Água Boricada	99
Tabela 16.	Aspecto das amostras de Água Boricada	100
Tabela 17.	Valores de pH e concentração de ácido bórico nas amostras de Água Boricada	102
Tabela 18.	Resultados do teste de eficácia antimicrobiana nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório.....	107
Tabela 19.	Redução do inóculo inicial, em número de log, no teste de eficácia antimicrobiana nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
A.	<i>Aspergillus</i>
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B.	<i>Bacillus</i>
BP	<i>British Pharmacopoea</i>
C.	<i>Candida</i>
CoNS	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
Dc	Depois de Cristo
E.	<i>Escherichia</i>
F. BRAS. IV	Farmacopéia Brasileira 4ª Edição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramma
h	Hora
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
JP XIV	<i>The Japanese Pharmacopoeia 14th Edition</i>
mg	Miligramma
min	Minuto
ml	Mililitro
N	Normal (normalidade da solução)
NMP	Número Mais Provável
°C	Graus Celsius
P.	<i>Pseudomonas</i>
p.a.	Para análise
p/v	Peso por volume
pH	Potencial hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
QTE	Quantidade
RDC	Resolução de Diretora Colegiada
s	Segundo
S.	<i>Staphylococcus</i>
SI	Solução indicadora
SV	Solução volumétrica
sp.	Espécie
SR	Sem Redução
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP 25	<i>The United States Pharmacopoea 25th Edition</i>

RESUMO

A Água Boricada é uma solução de ácido bórico, *não estéril*, com várias indicações terapêuticas, inclusive para aplicações oftalmológicas. Entretanto, as monografias oficiais requerem que as preparações farmacêuticas de uso oftálmico sejam estéreis, face aos riscos de soluções apresentando contaminação microbiana desencadearem sérias infecções nos olhos dos usuários. Com a finalidade de verificar o nível de consumo e a comercialização do produto, foram aplicados dois protocolos de investigação: um para a população e o outro em farmácias e drogarias. Objetivando avaliar a Água Boricada utilizada para aplicações oftalmológicas e os riscos a que os usuários estão expostos, foram analisadas 47 amostras, de 25 fabricantes distribuídos em 7 estados brasileiros, avaliando as embalagens (tipo de material, inviolabilidade, volume), rotulagem (prazo de validade, formulação, indicações de uso e outras informações relevantes), execução de ensaios microbiológicos (contagem de viáveis totais e pesquisa de patógenos) e físico-químicos (aspecto, pH e teor de ácido bórico). Foi, ainda, avaliada a eficácia antimicrobiana intrínseca da Água Boricada, em 4 amostras preparadas em laboratório (com água destilada e deionizada, em pH ácido e neutro). Os protocolos de investigação comprovaram que a Água Boricada é utilizada principalmente para aplicação oftalmológica e que um grande número de estabelecimentos vende o produto. Os procedimentos experimentais mostraram diferenças relevantes nas embalagens e nas informações constantes nos rótulos dos produtos avaliados, sendo que 63,83% das amostras analisadas deixaram de cumprir com um ou mais requisitos requeridos para as soluções de uso oftálmico. O teste de eficácia antimicrobiana mostrou diferenças significativas entre as 4 amostras produzidas em laboratório. Diante dos resultados, torna-se necessário regulamentar a fabricação e comercialização do medicamento em questão para aplicações oftalmológicas, visto que os usuários estão expostos aos riscos de utilizarem um produto apresentando contaminação microbiana e, conseqüentemente, de desenvolverem uma infecção ocular, com graves conseqüências.

PALAVRAS CHAVE: ácido bórico, medicamento, oftalmologia, pH

ABSTRACT

Boric acid solution can be presented as *non-sterile* solution, whose ophthalmic application is one of several others. However, according to pharmacopoeial monographs, solutions for ophthalmic use have to be sterile, for preventing the risk of serious ophthalmic infections. In order to verify the consumption level and the product commerce, two investigation protocols were applied, either for consumers or pharmacies and drugstores. To evaluate the quality of boric acid solution for ophthalmic use and its risks for the users, 47 samples were analyzed, from 25 manufacturers distributed in 7 Brazilian States, evaluating requirements such as packaging (material, inviolability, volume contained), labeling (period of validity, formulation, therapeutic indications and any other relevant information), microbiological tests (counting of total viable cells and pathogens research), physicochemical (pH and content of boric acids) and visual aspect (clarity). Intrinsic antimicrobial activity was also evaluated on 4 samples prepared in the laboratory (using distilled and deionized water, either in acid or neutral medium). Investigation protocols indicated that boric acid solution is a very popular drug for ophthalmic use, largely merchandised in Brazil. Relevant differences were shown in packaging and labeling of the products; 63,83% of the analyzed samples presented non-conformity to one or more pharmacopoeial requirements for ophthalmic solutions. Significant differences were evidenced among the 4 samples produced at the laboratory for antimicrobial activity. These results point out the need of controlling the production and commerce of boric acid solutions, since the use of non-conformity products present a serious risk of ocular damage.

KEY WORDS: boric acids, drugs, ophthalmologic, pH

1 INTRODUÇÃO

A Água Boricada é uma solução aquosa de ácido bórico *não estéril*, encontrada no comércio, normalmente, nas concentrações de 2% e 3%. É um produto farmacopéico (na concentração de 3%), inscrito na 1ª Edição da Farmacopéia¹ Brasileira (Silva, 1926), sendo, então, isento de registro, conforme Legislação Sanitária Vigente: Resolução RDC² N° 132/2003 (Brasil, 2003).

O produto é utilizado popularmente, com várias indicações terapêuticas, conforme comprovado nos rótulos dos produtos existentes no mercado brasileiro, dentre elas: *conjuntivites*, ferimentos, furúnculos, limpeza dos bicos de seios antes da amamentação, entre outros. Pode ser aplicada na forma de compressas ou lavagens, inclusive *ocular* e *pós-cirúrgica*. Todavia, a Resolução RDC 277/2002 (Brasil, 2002) determina que apenas as formulações a 2% podem ser utilizadas para aplicação oftalmológica.

1.1 MOTIVAÇÃO

As monografias oficiais, Farmacopéia Brasileira³ (1988), *Farmacopea Europea* (1988), *The Japanese Pharmacopoeia*⁴ (2001), Farmacopeia Portuguesa (2002), *British Pharmacopoeia*⁵ (2002), *The United States Pharmacopea*⁶ (2002), determinam que as preparações oftálmicas devem ser estéreis, enquanto nas demais preparações para uso tópico é aceitável um limite de microrganismos viáveis.

As preparações de uso oftalmológico, apesar de não serem introduzidas em uma cavidade corporal interna, entram em contato com tecidos que são muito sensíveis à contaminação (Lachman, Lieberman e Kanig, 2001), principalmente

¹ O termo *farmacopéia* vem do grego *pharmakon*, que significa “fármaco” e *poiein*, que significa “fazer” (Ansel, Popovich e Allen Jr., 2000). As farmacopéias são códigos farmacêuticos oficiais ou oficialmente adotados, os quais estabelecem a identificação, padrões de qualidade e métodos de análise dos fármacos (F. BRAS. IV, 1988).

² A sigla RDC significa Resolução de Diretoria Colegiada.

³ A Farmacopéia Brasileira (1988) passará a ser citada pela sua sigla oficial: F. BRAS. IV.

⁴ A The Japanese Pharmacopoeia (2001) passará a ser citada pela sua sigla oficial: JP XVI.

⁵ A British Pharmacopoeia (2002) passará a ser citada pela sua sigla oficial: BP.

⁶ A The United States Pharmacopea (2002) passará a ser citada pela sua sigla oficial: USP 25.

quando há traumatismo no globo ocular, devido a um acidente, alguma patologia ou devido à cirurgia. A utilização de preparações oftálmicas que não tenham cumprido com padrões de qualidade, poderá ocasionar sérios danos ao usuário, inclusive cegueira, devendo, então, as preparações oftálmicas obedecer a determinados requisitos, como: esterilidade, pH adequado, limpidez (no caso de soluções) e precisão da composição (Prista, Alves e Morgado, 1996).

É importante verificar o valor do pH, face à sua importância no tratamento terapêutico, pois determina a eficácia do produto e o grau de irritação que pode ocasionar nos olhos (Korolkovas e Burckhalter, 1982; Prista, Alves e Morgado, 1990).

Ultrapassando as barreiras defensivas do organismo, as preparações oftálmicas, além de estarem isentas de contaminação microbiana, não devem conter produtos tóxicos. Desta forma, a seleção dos componentes da formulação e o processo de fabricação devem ser realizados de modo a evitar contaminação física, química e microbiológica (Lachman, Lieberman e Kanig, 2001).

Como na monografia da Água Boricada não consta indicação para uso oftálmico e não há exigência de esterilidade (Silva, 1926), os cuidados envolvidos na sua fabricação não são tão rígidos, como o tipo de água utilizada no processo, o grau de contaminação das matérias-primas, o grau de higienização dos frascos para acondicionamento do produto, entre outros. No processo de fabricação da Água Boricada não são utilizadas técnicas assépticas que permitam a obtenção de um produto estéril e o mesmo não passa por nenhum processo de esterilização. Desta forma, o produto pode conter uma carga microbiana considerável.

O produto é utilizado por usuários de lentes de contato e também para o cuidado das lentes. Segundo Mims et al. (1999), o uso excessivo das lentes de contato pode reduzir os mecanismos de defesa dos olhos, permitindo a instalação de patógenos. Os autores alertam que a utilização de preparações oftálmicas ou das soluções de limpeza de lentes contaminadas constitui uma via de transmissão direta de muitas bactérias.

A Água Boricada é recomendada para uso oftálmico após cirurgia de catarata (Schaefer, 2003) e após blefaroplastia (Freitas, 2004). O produto torna-se de risco, pois, de acordo com as indicações apresentadas, entra em contato com mucosas, as quais podem apresentar quebra no epitélio corneal, facilitando a entrada de possíveis microrganismos existentes no produto.

Comercializada em todo o país, a Água Boricada é adquirida principalmente para uso oftalmológico e não é exigida a sua esterilidade, apesar de que as farmacopéias determinam que todos os produtos aplicados nos olhos sejam estéreis. Por isso, a pesquisa descrita nesta dissertação é de interesse em Saúde Pública, através da qual mostram-se as condições microbiológicas de amostras de Água Boricada que estão sendo comercializadas, relacionando com os riscos a que os usuários estão expostos ao utilizar um produto oftalmológico não estéril.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a Água Boricada utilizada para aplicações oftalmológicas e os possíveis riscos a que os usuários estão expostos.

Para atingir o objetivo geral, foram realizadas as seguintes etapas:

1. verificar o nível de consumo e utilização da Água Boricada pela população, a forma mais frequente de aplicação do produto e como o usuário chegou até o produto;
2. avaliar a comercialização do produto pelas farmácias e drogarias, objetivando constatar a frequência de estabelecimentos que vendem o produto, se algum fator influencia na venda e qual a principal forma de venda (receituário médico, pedido do cliente, indicação no balcão);
3. avaliar as embalagens e as informações constantes na rotulagem dos produtos adquiridos;
4. realizar ensaios microbiológicos na Água Boricada comercializada no Brasil;
5. medir o pH das amostras;
6. determinar o teor de ácido bórico nas amostras;
7. relacionar os resultados dos procedimentos experimentais ao uso da Água Boricada em aplicações oftalmológicas; e
8. verificar a possível eficácia antimicrobiana do produto.

1.3 JUSTIFICATIVA

A Água Boricada é bastante consumida pela população, principalmente na conjuntivite, fato este que pode ser comprovado no surto de conjuntivite ocorrido em 2003, no Município de Caraguatatuba, em São Paulo, quando houve falta de Água Boricada nas drogarias da Cidade, segundo notícias publicadas nos jornais da Cidade (Litoral Virtual, 2003 a,b).

A Água Boricada quando inscrita no Formulário Médico Farmacêutico Brasileiro (LUCAS, 1959), tinha indicação para uso “em curativos como antisséptico”, no qual não constava indicação para uso oftálmico e também nenhuma exigência sobre a esterilidade do produto.

Nos dias atuais, a principal aplicação deste produto é ocular, apesar de ser um produto não estéril e a esterilidade é exigida pelas farmacopéias (F. BRAS. IV, 1988; *Farmacopea Europea*, 1988; BP, 2002; USP 25, 2002) para todas as preparações oftálmicas. Na literatura, consta que a Água Boricada é frequentemente alterada devido ao crescimento de fungos, sendo recomendado o acondicionamento do produto em pequenas embalagens (Prista e Alves, 1973).

Desta forma, existe a possibilidade de produtos contaminados estarem sendo comercializados, havendo, então, o risco do produto desencadear infecções oculares graves.

O risco da utilização de preparações oftálmicas contaminadas foi descrito por Prista, Alves e Morgado (1990): *“Na realidade, é um facto [sic] incontroverso que as soluções oftálmicas contaminadas por microrganismos podem causar lesões de extrema gravidade ao paciente a que foram aplicadas, sendo, por vezes, responsáveis pelos tipos mais sérios de úlceras córneas observadas na clínica.”*

Torna-se necessária a avaliação da Água Boricada para aplicações oftalmológicas, visto que esta forma de aplicação está relacionada a questões de Saúde Pública, fornecendo subsídios para ações de Vigilância Sanitária e embasamento para a revisão de legislações.

Não há especificações técnicas detalhadas para o produto, como, por exemplo, a faixa de pH. Pesquisas apontam para a importância do pH, tanto para a eficácia da capacidade antimicrobiana de conservantes quanto para o grau de virulência de microrganismos (Bernardis et al., 1998; Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

É um produto pouco estudado, como pôde ser verificado durante o levantamento bibliográfico para o desenvolvimento desta dissertação. Assim, este trabalho vem suprir a falta de informações sobre o uso da Água Boricada em aplicações oftalmológicas.

Esta pesquisa poderá fornecer subsídios para as ações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), embasando cientificamente a necessidade de rever a monografia do produto e sua legislação.

1.4 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação está dividida em 6 capítulos, sendo o primeiro destinado à introdução. No segundo consta uma revisão bibliográfica do assunto, abordando tópicos relevantes para o desenvolvimento desta pesquisa. No terceiro é abordada a metodologia empregada para o desenvolvimento do trabalho, no quarto estão apresentados os resultados e no quinto as discussões. Finalizando, no sexto capítulo são apresentadas as conclusões e sugestões para futuros trabalhos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, apresenta-se uma revisão da literatura sobre a anatomia e fisiologia do olho, as doenças oculares, a Água Boricada, o ácido bórico, as preparações oftálmicas, os microrganismos e a metodologia utilizada nos testes microbiológicos, físico-químicos e de eficácia antimicrobiana.

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO OLHO

O olho humano (figura 1) é composto pelo globo ocular, pálpebras, músculos do globo ocular e da pálpebra superior, aponevrose de Tenon, aparelho lacrimal, vasos e nervos da órbita (Prista, Alves e Morgado, 1995).

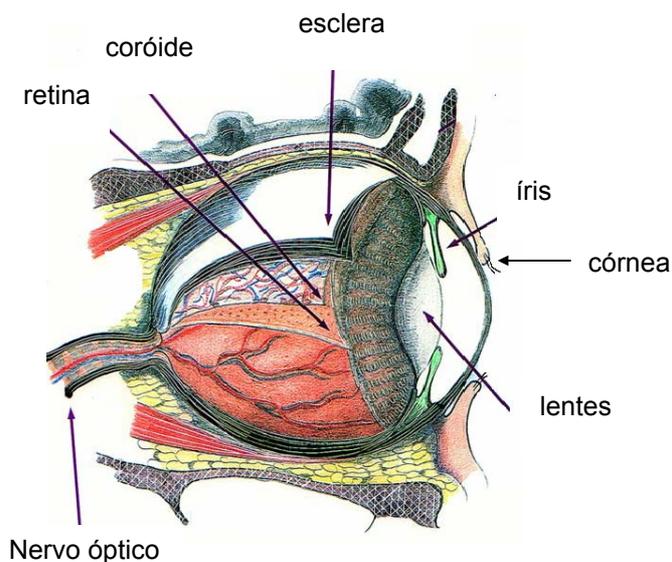


Figura 1 – Estrutura do olho humano.
Fonte: adaptada de Klotz et al. (2000).

A parede do globo ocular humano é composta por três camadas: externa - fibrosa (esclera e córnea), intermediária - músculo-vascular (coróide, corpo ciliar e íris) e nervosa (retina) e contém três meios: humor aquoso, cristalino e humor vítreo (Prista, Alves e Morgado, 1995; Hecht, 2000).

As pálpebras são formações músculo-membranosas que se mantêm lubrificadas e carregadas de líquido. Possuem duas funções: proteção mecânica do

globo ocular e formação de um meio ótimo para a córnea (Prista, Alves e Morgado, 1995; Hecht, 2000).

A proteção mecânica da superfície ocular é realizada por meio de duas barreiras anatômicas, que previnem a penetração de patógenos para além da superfície anterior do globo. A primeira é o septo orbital, um fino tecido de fibras (em multicamadas) que divide a órbita da pálpebra em espaços pré e pós-septo e servem como uma barreira física para prevenir infecções. A segunda é a conjuntiva (Klotz et al., 2000).

A conjuntiva é uma membrana mucosa que cobre a face posterior das pálpebras (conjuntiva palpebral ou tarsal), aderindo a elas intimamente, recobrando, também, a parte anterior do olho (conjuntiva bulbar). Esta é transparente, permitindo a visualização da esclera ("branco do olho"). No caso de inflamação, deixa de ser incolor, devido à dilatação dos vasos sanguíneos (Mendes, 2001a).

Além da função de proteção (recobrimento), a conjuntiva possui as seguintes funções: *mecânica* (permite a livre movimentação dos globos oculares, graças às pregas do fundo de saco); *lubrificante*, contribuindo para a autolubrificação e também da córnea; e *defensiva*, através da formação de uma barreira, em conjunto com a lisozima produzida pelas lágrimas, contra a penetração de microrganismos (Mendes, 2001a).

A conjuntiva contribui para formar o filme lacrimal, o qual é formado por três camadas: uma fina camada lipídica externa, para a prevenção da evaporação; uma intermediária aquosa, mais espessa, que contém as glândulas lacrimais; e uma fina camada de muco mais interna, que se adere à córnea (Lemp, 1973; Wood, 1999; Hecht, 2000). O filme lacrimal, renovado a cada movimento da pálpebra, fornece uma importante superfície úmida para a córnea, necessária para a formação de uma superfície oticamente adequada. A utilização de soluções com pH abaixo de 4 ou superior a 9 causam distorções neste filme (Hecht, 2000).

O filme lacrimal é a primeira linha de defesa do organismo. A composição, o volume e o fluxo das lágrimas diminuem a penetração ocular da droga por diluição e drenagem pelo ducto nasolacrimal. O lacrimejamento pode ser estimulado pela instilação da droga, aumentando a diluição da mesma (Abelson, Gifford e Chapin, 2002). Este sistema, em conjunto com as pálpebras, pode remover rapidamente as soluções instiladas nos olhos (Hecht, 2000).

A produção constante de secreções e o movimento das pálpebras removem as bactérias e poeiras da superfície ocular pelas vias lacrimais, para a cavidade nasal (Prista, Alves e Morgado, 1992; Hecht, 2000).

A lisozima, enzima presente nas lágrimas, também colabora na remoção de microrganismos; normalmente destrói os microrganismos saprófitos, mas possui ação reduzida sobre os patogênicos (Hecht, 2000). Possui a capacidade de romper a parede celular de bactérias Gram positivas e até de Gram negativas. Em consequência, a conjuntiva possui uma flora microbiana escassa (Pelczar et al., 1996; Tortora e Funke, 2000).

Para a manutenção de uma córnea saudável e da acuidade visual, é necessária uma conjuntiva saudável. Infecções da conjuntiva podem atingir a córnea, causando perfuração e úlceras corneas (Wood, 1999).

A córnea, fina e transparente, é avascular e formada, principalmente, pelo epitélio corneal, estroma e endotélio corneal (Prista, Alves e Morgado, 1995; Hecht, 2000). Está em contato direto com o meio ambiente e possui defesas imunes limitadas (Klotz et al., 2000), mas possui outros mecanismos para prevenir infecção bacteriana. Entre estes, está a produção contínua de lágrimas que, junto com o movimento da pálpebra, servem para remover fisicamente bactérias dos olhos. As lágrimas são também importantes para manter a secreção que contém imunoglobulina A, amilase e lisozima, os quais estão envolvidos na proteção do olho contra infecção bacteriana (Watson, Reyes e McMurray, 1978; Masinick et al., 1997).

O epitélio corneal íntegro constitui uma barreira eficiente contra a invasão de bactérias patogênicas. A ocorrência de abrasão na superfície da córnea, que pode ser ocasionada inclusive por lentes de contato, pode permitir a penetração de microrganismos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de infecções na córnea. A cicatrização, devido a traumas, infecção, entre outros, normalmente, forma uma mancha opaca permanente. Quando a transparência da córnea é alterada, o poder de resolução e acuidade visual são afetados (Hecht, 2000).

A possibilidade do usuário ferir a própria córnea, devido à dificuldade na inserção e remoção das lentes de contato, pode causar defeitos epiteliais (Adams et al., 1983), facilitando a penetração de microrganismos e, em consequência, o desenvolvimento de úlceras corneas (Dunn, Mondino e Weissman, 1989).

A superfície ocular possui, além da proteção mecânica, proteção imunológica para a defesa (Klotz et al., 2000). Apesar dos olhos estarem bastante protegidos

contra a invasão de microrganismos, eles são vulneráveis às infecções, acarretando sérias consequências ao indivíduo (Mims et al., 1999).

A maioria dos patógenos oculares não pode penetrar a camada epitelial da córnea intacta, que é protegida pela pálpebra e pelo filme lacrimal. O organismo possui mecanismos de defesa ativos e passivos que protegem os tecidos da córnea contra a invasão bacteriana, porém, havendo o fracasso no mecanismo de proteção da córnea ou o epitélio corneal violado, as bactérias estão livres para invadir a córnea e provocar infecções. O mecanismo ativo ocorre em 8 a 10 h após o dano córneo (Schaefer et al., 2001).

A resposta imune intra-ocular é limitada e, em consequência, uma ampla faixa de microrganismos causam infecção intra-ocular (Callegan et al., 2002).

2.2 DOENÇAS OCULARES

A exposição direta do olho ao ambiente e sua estrutura única torna-o vulnerável a muitas doenças infecciosas (Klotz et al., 2000). Entretanto, o hospedeiro possui muitos mecanismos de defesa que são essenciais para evitar a penetração de patógenos, como barreiras físicas (integridade morfológica da mucosa), remoção física dos microrganismos (ação de piscar) e processos bioquímicos, como a lisozima e processos inflamatórios (Masur e Fauci, 1988). A ação contínua das lágrimas em conjunto com o movimento das pálpebras, mantém a conjuntiva limpa, de forma que os microrganismos necessitam de eficientes mecanismos para provocar infecções (Mims et al., 1999).

Não apenas os pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida ou outra condição de imunocomprometimento sistêmico, apresentam risco de infecções oculares severas, mas também aqueles que apresentam rompimento da função protetora da barreira do epitélio da superfície ocular, devido à doença da superfície ocular ou que sofreram cirurgia ocular (Schein et al., 1992).

Na ocorrência de quebra da barreira anatômica, as defesas do organismo muitas vezes são insuficientes para prevenir a perda da visão (Klotz et al., 2000). Alterações nas secreções lacrimais (olho seco) ou danos à conjuntiva ou pálpebras (fechamento inadequado) também propiciam a instalação de microrganismos (Thomas, 1994; Mims et al., 1999).

A identificação oportuna dos microrganismos envolvidos e tratamento adequado são primordiais (Klotz et al., 2000). Um número crescente de infecções tem sido provocado por microrganismos considerados como “não patogênicos”, principalmente, em indivíduos cujos fatores de resistência estão comprometidos, pois a capacidade do microrganismo em provocar uma doença é influenciada pela condição imunológica do hospedeiro, além dos fatores de virulência do microrganismo. Indivíduos tornam-se mais suscetíveis às doenças em situações de *stress* físico e emocional, como privação do sono, ansiedade, depressão e fadiga. Crianças e idosos também são mais suscetíveis (Pelczar et al., 1996).

Segundo Kanski (2000), a blefarite é uma doença ocular muito comum, cuja etiologia é incerta, apesar da seborréia e infecção pelo *Staphylococcus* serem importantes. É uma inflamação nas pálpebras, tendendo a ser crônica e pode ocorrer em conjunto com conjuntivites, devido às estruturas envolvidas estarem anatomicamente unidas (Seewoodhary e Stevens, 1999).

A conjuntiva pode ser afetada por diversas doenças, necessitando de diagnóstico, tratamento e medidas apropriadas (Wood, 1999).

As conjuntivites podem ser classificadas como *infecciosas*, provocadas por vírus, bactérias e fungos; e *não infecciosas*, que podem ser de origem alérgica, mecânica, química e, ainda, decorrentes de radiações (Wood, 1999; Seewoodhary e Stevens, 1999). O tipo de secreção é um indicativo do tipo de conjuntivite, mas a hiperemia está sempre presente (figura 2), em decorrência da dilatação dos vasos sanguíneos da conjuntiva. É importante relatar que não há dor ocular e, quando existir, indica o comprometimento da córnea (Mendes, 2001a). Alguns oftalmologistas têm dificuldade para diagnosticar corretamente esta doença (Abelson e McGarr, 1998). Segundo Wood (1999), as conjuntivites possuem sintomatologia e sinais clínicos distintos, porém, os olhos vermelhos estão sempre presentes.

O espectro de microrganismos causando conjuntivite varia ao redor do mundo, havendo necessidade de realizar uma cultura para fazer um diagnóstico específico do microrganismo envolvido (Wood, 1999).

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* são exemplos de microrganismos causadores de conjuntivite bacteriana (Wood, 1999). O *S⁷. aureus* é apontado como o microrganismo mais comum envolvido em conjuntivites bacterianas (Abelson e McGarr, 1998). Estas são freqüentes e de natureza

autolimitada, porém, o tratamento acelera a recuperação, previne complicações e restabelece conforto ao paciente. As seqüelas sérias são raras, mas podem conduzir a complicações, como o desenvolvimento de úlceras córneas, levando à cicatrização e perda da visão. A infecção causada por *P.*⁸ *aeruginosa* pode progredir para endoftalmite, e qualquer microrganismo pode produzi-la em pacientes com fístulas (Abelson e McGarr, 1998).

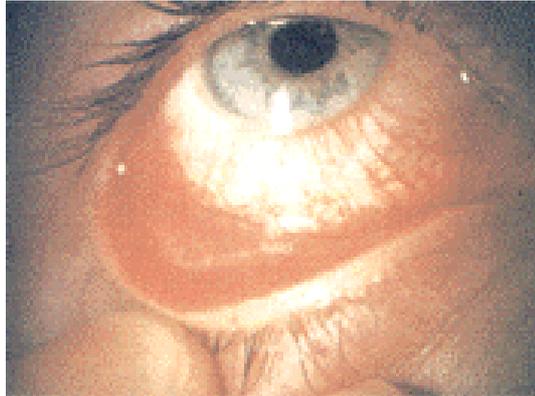


Figura 2 – Fotografia de olho afetado por conjuntivite bacteriana, mostrando a dilatação dos vasos.
Fonte: Mendes, 2001b.

A conjuntivite pode ainda evoluir para infecção intra-ocular e até provocar alterações sistêmicas, principalmente, em crianças (Mendes, 2001b).

Microrganismos instalam-se na superfície da córnea, produzindo toxinas solúveis que penetram nos tecidos, desencadeando a resposta patológica. O *Staphylococcus aureus* atua deste modo, cuja difusão das próprias toxinas é auxiliada pela secreção da hialuronidase (Prista, Alves e Morgado, 1995).

Espécies de fungos patogênicos secretam enzimas que destroem as barreiras anatômicas, constituídas pelo colágeno estromal, auxiliando na invasão dos tecidos da córnea (Jones, 1980, citado por Thomas, 1994).

Infecções córneas são responsáveis por uma grande proporção de cicatrizes da córnea, que é uma causa significativa de perda visual e cegueira nos países em desenvolvimento (Garg e Rao, 1999). A infecção da córnea foi considerada como a causa principal de morbidez ocular e cegueira mundial (Abiose, 1990, citado por Kunitomo et al., 2000).

⁷ A sigla *S.* significa *Staphylococcus*

⁸ A sigla *P.* significa *Pseudomonas*

Bactérias, vírus e fungos podem causar infecções na córnea, cujo diagnóstico incorreto e tratamento inadequado podem resultar no comprometimento da visão (Gombos, 1979).

A infecção pode ser *superficial*, afetando apenas o epitélio da córnea (ceratite epitelial) ou *profunda*, atingindo o estroma, sendo, então, denominada de ceratite estromal (Gombos, 1979; Klotz et al., 2000).

Qualquer microrganismo pode invadir o estroma córneo se os mecanismos de defesa córneos, como pálpebra, filme lacrimal e epitélio córneo estiverem comprometidos (Garg e Rao, 1999; Miller, 2000).

Rompimentos crônicos da superfície ocular são riscos potenciais para o desenvolvimento de ceratite bacteriana, permitindo que microrganismos patogênicos se estabeleçam no estroma subjacente através das rupturas da barreira epitelial (Schein et al., 1988).

A ceratite bacteriana é considerada a maior ameaça nas infecções oculares, devido à alta incidência e às complicações potenciais (Schaefer et al., 2001).

A severidade desta infecção depende da condição subjacente da córnea e a patogenicidade das bactérias. A ceratite bacteriana é rara na ausência de fatores de predisposição, como trauma ocular, doenças da superfície ocular e uso de lentes de contato (Dart, Stapleton e Minassian, 1991; Bourcier et al., 2003), pois a maioria dos agentes bacterianos não consegue atravessar as barreiras em situações normais (Miller, 2000).

Os patógenos bacterianos devem primeiramente interagir com os fatores da superfície ocular para conseguir atingir o epitélio corneal e causar ceratite infecciosa (Fleiszig et al., 1994), que é uma doença ocular potencialmente ameaçadora da visão, tendo como vetores etiológicos bactérias, vírus, fungos e parasitas (Miller, 2000; Jeng e Mcleod, 2003). Os sintomas clínicos da ceratite microbiana são dor, olhos vermelhos, excesso de secreção, fotofobia e inchaço das pálpebras (Aristoteli, Bojarski e Willcox, 2003).

Esta infecção produz escavação do epitélio da córnea, com infiltração de células inflamatórias e necrose dos tecidos (Holden et al., 2000 citado por Aristoteli, Bojarski e Willcox, 2003), normalmente conduzindo a uma incapacidade visual severa (McLeod et al., 1995), necessitando de um diagnóstico inicial e intervenção terapêutica rápida, a fim de prevenir a perda visual (Miller, 2000; Schaefer et al., 2001; Jeng e Mcleod, 2003).

Ceratite provocada por bactérias Gram negativas segue um rápido curso destrutivo inflamatório (Garg e Rao, 1999). A perfuração da córnea pode ocorrer em menos de 24 horas, quando ocasionada por patógenos invasivos, como a *Pseudomonas aeruginosa* (Schaefer et al., 2001).

O *Staphylococcus* e a *Pseudomonas* estão entre os microrganismos mais comuns cultivados das úlceras bacterianas (Garg e Rao, 1999; Bourcier et al., 2003). O aumento da incidência de estafilococos coagulase negativa no desenvolvimento de ceratite bacteriana foi alertada por Bourcier et al. (2003).

A *Candida albicans* e o *Aspergillus niger* estão entre os fungos que provocam lesões na córnea (Gombos, 1979).

Estudando 102 casos de ceratite microbiana em pacientes com mais de 65 anos, Kunimoto et al. (2000) descobriram que 31,1% dos casos foram causados por *S. epidermidis*, 25,7% por fungos filamentosos, 13,5% por *Pseudomonas*, entre outros.

A córnea anormal em pacientes com síndrome dos olhos secos, ulceração crônica, eritema multiforme e infecção com HIV está sujeita a infecções fúngicas, mais comumente com espécies de *Candida*. A *C.⁹ albicans* foi encontrada ser a causa mais comum de ceratite microbiana (35%) em um grupo de 13 portadores de HIV (Hemady, 1995).

Os fatores de risco da ceratite bacteriana foram identificados por Schaefer et al. (2001), entre eles: usuário de lentes de contato (36%) e blefarite (21%). Entre as bactérias mais freqüentes estavam o *S. epidermidis* (40%) e *S. aureus* (22%).

A úlcera córnea bacteriana é uma doença séria que pode causar perda da visão ou até mesmo a perda dos olhos (Schein et al, 1989), a qual possui incidência significativamente alta em usuários de lentes de contato (Schaefer et al., 2001), particularmente devido a bactérias Gram negativas, como a *P. aeruginosa* (Dunn, Mondino e Weissman, 1989; Miller, 2000; Sharma et al., 2003). A mais séria complicação relacionada ao uso de lentes de contato é a úlcera bacteriana, a qual ameaça, além da visão, a integridade do globo ocular (Adams et al., 1983).

Em levantamento de dados retrospectivos em um hospital de Paris, Bourcier et al. (2003) verificaram que de 300 olhos com diagnóstico de ceratite microbiana, 50,3% estava relacionado ao uso de lente de contato. Fatores de risco sistêmicos

⁹ A abreviatura C. significa *Candida*.

(diabete *melitus*, artrite reumática, imunodeficiência, alcoolismo, entre outros) e história de doença da superfície ocular foram citados como fatores de risco potencial (Musch, Sugar e Meyer, 1983; Killingsworth et al., 1993).

A cicatrização da córnea como resultado de ceratite supurativa é uma causa importante de cegueira evitável. Sem tratamento, a ceratite supurativa pode conduzir à opacificação e à perfuração da córnea. A morbidez associada é o resultado de vários fatores e é diretamente afetada por dificuldades no monitoramento do paciente devido à falta de recursos para diagnóstico e tratamento apropriados (Leck et al., 2002).

A importância de um tratamento específico na ceratite fúngica, que requer identificação rápida e precisa dos microrganismos causadores, foi destacada por Foster (1992). Alertou que métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial, inclusive microscopia e cultura podem ser negativos, apesar de uma apresentação clínica clara de ceratite supurativa, possivelmente, devido à dificuldade de obtenção do material córneo suficiente para investigação convencional.

Alguns passos podem contribuir para reduzir potencialmente as consequências severas de ceratite supurativa: conscientização dos fatores de risco, como trauma secundário e o uso de soluções oftálmicas contaminadas; diagnóstico precoce e instituição de terapia apropriada e encaminhamento de casos avançados para centros especializados (Garg e Rao, 1999).

Em particular, usuários de lentes de contato devem ser alertados sobre o risco potencial da ceratite bacteriana e instruídos sobre o cuidado das suas lentes (Schaefer et al., 2001), sendo necessário aumentar a educação pública sobre o uso de lentes de contato (Bourcier et al., 2003). Davis (1996) relatou que a inserção de lentes contaminadas é um fator de risco potencial, afirmando que a ceratite infecciosa continua sendo uma preocupação para usuários e fabricantes de lentes de contato, apesar de poucos pacientes acometidos por esta doença sofrerem perda permanente da visão.

A endoftalmite é uma rara, mas séria infecção ocular, resultando frequentemente em perda visual (Eifrig et al., 2003; Benz et al., 2004). É uma inflamação intraocular, em consequência da introdução de um agente infeccioso para dentro do segmento posterior do olho, envolvendo a câmara anterior e a cavidade vítrea do olho (Klotz et al., 2000; Callegan et al., 2002). Frequentemente, ocasiona danos irreversíveis nas delicadas células fotorreceptoras da retina

(Callegan et al., 2002). O tratamento deve ser imediato, com terapia antibiótica de largo espectro (Benz et al., 2004). Mesmo com terapia ofensiva e intervenção cirúrgica, endoftalmites geralmente resultam na perda parcial ou total da visão e até do olho (Callegan et al., 2002).

A gravidade da endoftalmite causada por organismos Gram negativos foi descrita também por Puliafito et al. (1982) e Rowsey et al. (1982), a qual pode levar à perda visual, mesmo com tratamento imediato com antibiótico intraocular e muitas vezes com vitrectomia.

Geralmente, o acesso dos agentes infecciosos ao segmento posterior do olho ocorre após cirurgia, trauma (endoftalmite exógena) ou proveniente de um sítio anatômico distante (endoftalmite endógena), decorrente de uma infecção sistêmica (Irvine et al., 1992; Klotz et al., 2000; Callegan et al., 2002). Apesar de pouco comum, a endoftalmite pode ser resultado de uma ceratite sem tratamento adequado (Klotz et al., 2000; Callegan et al., 2002).

Normalmente, a endoftalmite é causada por bactérias Gram positivas, apesar de, em 6% de 29% de casos reportados, terem sido isoladas bactérias Gram negativas (Eifrig et al., 2003).

A endoftalmite pós-operatória também pode acontecer entre semanas até anos após a cirurgia, fato este que pode ser devido à introdução de microrganismos de baixa virulência (Callegan et al., 2002).

2.3 ÁGUA BORICADA

A formulação da Água Boricada é (Silva, 1926; Lucas, 1959; Prista e Alves, 1973):

Ácido Bórico 30 g
*Água Destilada qsp*¹⁰ 1000 ml.

A Água Boricada pode ser usada fria ou aquecida, pura ou diluída, a critério médico, em lavagens ou embebida em algodão ou gaze (Lucas, 1959). O autor afirmou que o produto é de boa conservação, por ser antisséptico, não exigindo cuidados especiais de conservação, recomendando apenas que os frascos devem

¹⁰ A sigla qsp significa “quantidade suficiente para”.

ser bem fechados. Entretanto, Prista e Alves (1973) afirmaram que esta solução altera-se com frequência, devido ao crescimento de fungos.

A introdução do ácido bórico como colírio foi realizada pelo Dr. Samuel Theobald, médico nos Estados Unidos, no final do século XIX (Welch, 1997).

Segundo a *The Columbia Encyclopedia* (2003), a solução diluída de ácido bórico é comumente utilizada como antisséptico suave e para lavagem dos olhos, enquanto em Lucas (1959), a indicação da Água Boricada é apenas para uso “em curativos como antisséptico”.

Em Parfitt (1999) são citados vários produtos para uso oftálmico contendo ácido bórico, comercializados em diversos países, como Canadá, França, Itália, Alemanha, Espanha e Estados Unidos.

Soluções aquosas de ácido bórico são empregadas para lavagem ocular, pois não são irritantes; uma solução a 2,2% é isotônica com o filme lacrimal, porém, hemoliza os glóbulos vermelhos (Hecht, 2000). A solução aquosa a 3,3% tem pH de 3,8 a 4,8 (Parfitt, 1999).

2.4 ÁCIDO BÓRICO

O ácido bórico presente na Água Boricada ocorre nas formas de pó ou grânulos brancos, ou cristais incolores, transparentes, inodoros, muito solúveis em água, de sabor levemente ácido (Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1959). A fórmula química do ácido bórico é H_3BO_3 , com peso molecular igual a 61,83g. Possui como sinônimos: ácido borácico, ácido ortobórico e sal sedativo de Homberg. É solúvel em água, álcool e glicerol (Parfitt, 1999).

O ácido bórico é considerado um agente antisséptico. Korolkovas e Burckhalter (1982) referiram-se a agentes antissépticos como “aqueles utilizados para destruir microrganismos ou inibir sua reprodução ou metabolismo”.

Vários fatores determinam a eficácia dos antissépticos, como pH, temperatura, concentração, duração do contato com os microrganismos e presença de material orgânico, tais como sangue, pus e tecido necrótico (Korolkovas e Burckhalter, 1982).

No século 18, os boratos, conhecidos como sal sedativo, foram usados na pele. Antes desse tempo, os boratos foram usados como agentes de limpeza e por médicos árabes, os quais usavam-nos antes de 875 d.C. para medicação interna

(Houlsby, Ghajar e Chavez, 1986). O ácido bórico já foi utilizado como sedativo, analgésico, antiespasmódico, entre outras aplicações terapêuticas (Campos, 2003).

Os autores Korolkovas e Burckhalter (1982) afirmaram que o ácido bórico era usado como antisséptico, principalmente, em lavagens oculares, mas devido ao valor terapêutico ser duvidoso e à ingestão acidental e uso indiscriminado chegou a causar mortes, tendo sido considerado obsoleto. Silva (1985) declarou que “o ácido bórico não é mais recomendado para qualquer uso terapêutico”. Relatou também que a solução de ácido bórico a 2,5% é bacteriostática e não destrói muitas bactérias. “Não tem muito valor como desinfetante, mas tem sido usado como antisséptico em solução para uso oftálmico” (Silva, 1985).

Em estudo clínico, desenvolvido por Portellinha, Cai e Belfort Jr. (1983), verificou-se que a Água Boricada a 2%, quando aplicada em pacientes com blefarites ciliares, apenas diminui a sintomatologia, mas sem provocar alteração da flora bacteriana, apesar dos pacientes apresentarem uma melhora clínica da doença.

O ácido bórico é um ácido muito fraco que possui apenas efeito bacteriostático, mesmo em solução concentrada (Mingoia, 1967; Parfitt, 1999) e fracas propriedades fungistáticas (Parfitt, 1999). A solução de ácido bórico não é irritante aos tecidos, mesmo quando saturada (5,5%), podendo ser aplicada em mucosas delicadas. Normalmente, é utilizada solução aquosa de 3 a 4 % para lavagem da conjuntiva e da mucosa bucal (Mingoia, 1967). A solução possui efeito bacteriano reduzido, pois não destrói bactérias e é removida rapidamente pelas secreções oculares (Harvey, 1986). É utilizado em preparações oftálmicas, inclusive como tampão (Harvey, 1986), em conjunto com o borato de sódio e antimicrobiano em gotas oculares (Parfitt, 1999). Em Prista, Alves e Morgado (1995) o ácido bórico figura como um componente “antiinfecioso” empregado em colírios.

A capacidade de um veículo contendo tampão borato ser utilizado como sistema preservativo de agentes farmacêuticos oftálmicos foi investigada por Houlsby, Ghajar e Chavez (1986). O estudo foi conduzido nos termos especificados na USP para o teste de eficácia dos conservantes. A concentração do tampão, pH e osmolaridade do meio mínimo testado foram ajustadas para as condições encontradas em muitas formulações oftálmicas. Segundo os autores, todos os microrganismos avaliados (15 cepas de *Pseudomonas*, 12 cepas de bactéria entérica e 7 cepas de estafilococos) decresceram em número quando expostos ao

meio mínimo tamponado com borato. Na concentração de 0,75 % a 3 %, os boratos apresentaram atividade bacteriostática e fracos efeitos bactericidas quando adicionado ao caldo nutriente para cultura de *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *E.*¹¹ *coli*. Concluíram que, devido à ausência de proliferação e sobrevivência desses microrganismos no veículo tamponado com borato, este forneceu um aumento do nível de segurança para produtos oftálmicos.

Os pesquisadores verificaram ainda que o veículo tamponado com borato pareceu mais adequado em produtos oftálmicos que formulações com tampão fosfato. Salientaram que estes sistemas preservativos não são por si só considerados como critérios para eficácia fornecida pela USP XXI e que o tampão borato requer adição de outros agentes, provavelmente, a uma concentração muito baixa. Devido à taxa de mortalidade no veículo ser pequena, os pesquisadores recomendaram que cada formulação deve ser balanceada para alcançar a taxa de mortalidade desejada.

Para avaliar o risco microbiológico associado com tampão salina não preservado, contendo borato de sódio, Houlsby, Ghajar e Chavez (1988) desenvolveram outro estudo. Os resultados indicaram que o tampão borato teve atividade antimicrobiana mensurável, podendo controlar alguma contaminação microbiológica. Os autores verificaram que variando o tamanho do inóculo, o tempo de sobrevivência é estendido e, dependendo da cepa do microrganismo, este aumento não foi proporcional ao aumento do inóculo.

Uma solução de ácido bórico e borato de sódio foi testada por Yasunaga e Kean (1977) para o tratamento da conjuntivite química em neonatos após profilaxia com nitrato de prata. Descreveram que o ácido bórico não é irritante no saco conjuntival dos neonatos, sendo uma opção para irrigação oftálmica. Entretanto, devido ao risco de envenenamento do borato, não tem sido utilizado nos hospitais.

Apesar dos relatos de manifestações tóxicas e casos de envenenamento com boratos, a segurança no uso do ácido bórico é sustentada por pesquisa de dermatologistas, por estudos recentes com pomadas oftálmicas e outros (Houlsby, Ghajar e Chavez, 1986).

Na atualidade, o uso do ácido bórico é restrito à atividade bacteriostática e fungistática (Houlsby, Ghajar e Chavez, 1986; Campos, 2003). O ácido bórico tem

¹¹ A abreviatura *E.* significa *Escherichia*.

sido substituído por outros produtos menos tóxicos e mais eficazes (Parfitt, 1999). Segundo Campos (2003), muitos autores consideraram a possibilidade de extinção do uso do ácido bórico como medicamento, visto que há drogas mais eficazes, possibilitando a diminuição do número de intoxicações por este ácido. Descreveu, também, que o ácido bórico é absorvido pelas vias oral, percutânea e pela mucosa, sendo muito pouco absorvido pela pele íntegra. Porém, quando aplicado na pele lesada ou, principalmente, na pele íntegra sob oclusão, a absorção é consideravelmente importante. O ácido bórico tem efeitos citotóxico e cáustico leves. O mecanismo de ação é desconhecido.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a atividade do ácido bórico contra cepas de *Candida*. Testes *in vitro* com ácido bórico, realizados por Swate e Weed (1974), nas concentrações de 1 a 4% para inibir o crescimento de *C. albicans*, a 2×10^6 /ml em caldo caseína de soja, demonstraram que o crescimento não foi inibido em concentrações menores que 1%, mas ocorrendo a 4%.

O ácido bórico foi usado no tratamento de candidíase vulvovaginal, após os testes *in vitro* indicarem que o mesmo é fungistático contra *C. albicans* (Swate e Weed, 1974). Um tratamento realizado em 40 mulheres promoveu o alívio da sintomatologia em todas as pacientes avaliadas.

Através de ensaios *in vitro*, Van Slyke, Michel e Rein (1981) demonstraram que a concentração mínima inibitória (MIC) do ácido bórico para a *C. albicans* está na faixa de 12,5 a 50 mg/ml, eliminando de 50 a 90% do microrganismo após 48 h. Verificaram que o ácido bórico é fungistático para *C. albicans* e que a eficácia não está relacionada ao pH, visto que a variação de pH foi mínima (0,01).

Com resultados de testes *in vivo*, pesquisadores concluíram que a terapia com ácido bórico, para candidíase vulvovaginal, é segura, efetiva, barata e extremamente aceitável (Swate e Weed, 1974; Van Slyke, Michel e Rein, 1981).

Em estudo realizado por Jovanovic, Congema e Nguyen (1991), os pesquisadores verificaram que 98% das pacientes com candidíase vaginal crônica foram curadas com terapia de ácido bórico. Acrescentaram que não acreditam como outros autores sugeriram, que o fenótipo ou a alteração genética de espécies de *Candida* criam cepas mais resistentes. Concluíram que na candidíase vulvovaginal crônica, o ácido bórico parece ser uma possibilidade de tratamento e também para uso profilático. Afirmaram que a terapia com o ácido bórico pareceu ser muito mais eficaz para vulvovaginite micótica crônica que os agentes antifúngicos avaliados

(miconazol creme, clotrimazol creme, butoconazol creme, tampão violeta de genciana e nistatina oral).

Um ensaio clínico envolvendo uma paciente com AIDS, portadora de candidíase vulvovaginal, foi descrito por Shinohara e Tasker (1997). Após utilizar ácido bórico (cápsula vaginal 600 mg) e pomada com 5% de lanolina, a paciente alcançou completo alívio dos sintomas em 24h. Relataram que o ácido bórico tem propriedades fungistáticas, mas o mecanismo de ação é desconhecido, pressupondo que o efeito fungistático do ácido bórico pode ser o resultado de propriedades inerentes de ácido fraco.

Em investigação *in vitro* conduzida por Otero et al. (1999), 21 de 23 cepas (91%) de *C. glabrata* isoladas foram inibidas por ácido bórico na concentração de 0,6% ou superior. Afirmaram que *C. glabrata* requer maiores concentrações de ácido bórico para inibição *in vitro* que a *C. albicans*. O ácido bórico na concentração de 0,3% inibiu 62% das cepas, enquanto na concentração de 0,4% foram inibidas 97,2% das cepas.

Em estudo realizado por Sobel et al. (2003), verificou-se que o tratamento com ácido bórico em mulheres portadoras de vaginite, causada por *C. glabrata*, ofereceu uma taxa de sucesso razoável, sendo um tratamento barato e seguro, quando administrado por esta via.

A eficácia de um tratamento tópico a longo prazo com ácido bórico foi comparada por Gauschino et al. (2001) com um tratamento oral com itraconazol na cura e prevenção de candidíase vulvovaginal recorrente. Mostraram que o ácido bórico é efetivo como os azoles para o tratamento na infecção aguda com *C. albicans* e outras espécies. Concluíram que a terapia com ácido bórico é válida na cura da infecção vaginal e na prevenção de recaídas, porém, sua ação termina com a interrupção da terapia. Afirmaram que os mecanismos de tratamento com ácido bórico permanecem obscuros, citando que provavelmente a combinação das ações fungicida e micostática do ácido bórico resultaram na eficácia micológica e clínica. Harvey (1986) descreveu que os mecanismos de ação dos antimicrobianos são complexos.

O ácido bórico, administrado na forma de cápsulas intravaginais, foi considerado uma modalidade promissora de terapia para pacientes com vaginite causada por *Torulopsis glabrata* (Sobel e Chaim, 1997). No estudo conduzido pelos pesquisadores, 81% das 26 pacientes avaliadas revelaram melhora clínica ou cura,

enquanto 20 (77%) resultaram na erradicação micológica, levando à recomendação de terapia com ácido bórico para vaginite causada por *Torulopsis glabrata*.

O ácido bórico é um dos agentes tópicos mais utilizados para otomicose, mostrando-se efetivo em estudos clínicos, onde foram isoladas espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *S. aureus* (Slack, 1987).

Em pesquisa realizada por Albuquerque, Cavalcanti e Aguiar (1992) verificou-se que o ácido bórico é capaz de inibir o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas.

Um estudo piloto dos efeitos do tratamento de curta duração com ciclopiroxolamina foi comparado por Del Palacio et al. (2002) com um tratamento com ácido bórico em pacientes sofrendo de otomicose. Os autores compararam o tratamento de 64 pacientes, divididos em 3 grupos: grupo A (17) creme ciclopiroxolamina 1 %; grupo B (17) solução ciclopiroxolamina 1 % e grupo C (30) ácido bórico. Os resultados sugeriram que o tratamento de curta duração da otomicose com ácido bórico é tão efetivo clínica e micologicamente quanto a ciclopiroxolamina 1% (creme e solução). Observaram que a tolerância foi excelente com ciclopiroxolamina creme, mas 20% dos sítios tratados com solução de ciclopiroxolamina mostraram irritação leve (10%) ou moderada (10%), em contraste com 30 % dos sítios tratados com ácido bórico, o qual produziu vários ferimentos e dor (12,5%) em pacientes com membrana do tímpano perfurada.

Em estudo realizado por Ozcan et al. (2003), verificou-se que a administração de gotas fracamente ácidas, tal como ácido bórico e álcool pode ser uma parte da terapia inicial na otomicose. Verificaram que 67 de 87 pacientes (77%) recuperaram-se clinicamente em 2 semanas, quando se utilizou uma solução alcoólica a 4 % de ácido bórico, combinado com limpeza por sucção do canal do ouvido.

A suscetibilidade do *A.¹² niger* foi avaliada por Mishra, Mehta e Pal (2004), empregando o método de difusão em disco contra griseofulvina, mercuro cromo, miconazole, clotrimazole e ácido bórico, cujo isolado foi obtido de culturas a partir de material removido do ouvido de uma paciente com otomicose crônica. Verificaram que o fungo isolado era sensível a mercuro cromo e resistente a todas as outras combinações *in vitro* do teste de difusão em disco.

O efeito do ácido bórico no caldo lactose-peptona no crescimento de culturas do gênero *E. coli* e *Aerobacter* foi descrito por Poe e Charkey (1949). Foram

preparados meios de cultura contendo quantidades variáveis de ácido bórico de 0,25 a 0,60%, com pH ajustado para 6,5, 7,0 e 7,5. Observaram que o pH do meio causou pequena diferença no crescimento. A produção de gás foi um pouco inferior no meio com pH ajustado para 7,5. Uma pequeníssima quantidade de ácido bórico usado, a 0,25% retardou a produção de gás em comparação com o controle sem ácido bórico.

Uma pesquisa para a preservação de amostra simulada para teste de proficiência em água bacteriológica foi desenvolvida por Brodsky, Ciebin e Schiemann (1978). Utilizou-se como meio de preservação um caldo nutriente contendo 1,8% de ácido bórico, concentração essa que mostrou um maior efeito preservante. Comprovaram que a adição de 1% cloreto de sódio e o ajuste do pH em 7,0 melhorou a performance do meio de preservação, o qual demonstrou a manutenção das culturas de *E. coli* para acima de 10 dias à temperatura ambiente. Afirmaram que a estabilidade das culturas durante armazenamento prolongado depende da densidade inicial das células e da preservação do próprio meio.

O ácido bórico é utilizado há mais de 20 anos para preservar amostras de urina durante transporte para exames bacteriológicos (Meers e Chow, 1990). Boratos foram usados por Watson e Duerden (1977) para preservar amostras de urinas por 24 h antes do cultivo. Os autores descobriram que o ácido bórico na concentração de 1,8% é tóxico para cepas de *E. coli* na densidade de 10^7 UFC/ml¹³. Fayinka (1971), citado por Sobel e Chaim (1997), verificou também que tempos longos de exposição ou concentrações elevadas, especialmente acima de 3%, poderiam causar redução em bactérias Gram negativas.

Ensaio *in vitro* conduzidos por Meers e Chow (1990) demonstraram que o ácido bórico, na concentração de 10 a 20g/l, possui ação bacteriostática e fungistática para quase todas as bactérias e fungos encontrados na urina, inclusive para *C. albicans*. Para uma de 17 cepas *P. aeruginosa* testadas, o ácido bórico apresentou efeito ligeiramente bactericida, na concentração de 10g/l.

Em estudo desenvolvido por Justiz e Boada (1985), para avaliar o emprego do ácido bórico como conservante de amostras de urina, para ensaio microbiológico quantitativo, verificou-se que o ácido bórico não impede o crescimento das bactérias presentes na urina. Com o método testado, concluíram que o ácido bórico é útil

¹² A abreviatura A. significa *Aspergillus*.

¹³ UFC/ml – Unidade Formadora de Colônia por mililitro.

como preservante no transporte e conservação de amostras de urina, possibilitando a realização de urocultivo, independente do tempo.

O ácido bórico na concentração em torno de 2% foi considerado um preservativo adequado para amostras de urina, durante transporte para realização de ensaio microbiológico (Lum e Meers, 1989, citado por Parfitt, 1999).

A relação entre a estrutura química de compostos e a propriedade antimicrobiana não é bem conhecida. O borato de sódio possui atividade bacteriostática e fungistática reconhecida, sendo, então, utilizado como conservante, enquanto derivados do anidrido bórico possivelmente tenham propriedade antimicrobiana (Watanabe et al., 1988).

2.5 PREPARAÇÕES OFTÁLMICAS

Desde a antiguidade utilizam-se preparações oftálmicas para o tratamento de doenças oculares, sendo encontrados registros nos papiros egípcios (Hecht, 2000).

A BP (2002) define as preparações oftálmicas como preparações na forma líquida, semi-sólida ou sólida, estéreis, destinadas para administração sobre o globo ocular e/ou conjuntiva ou para inserção no saco conjuntival. Aponta várias categorias de preparações oftálmicas, entre elas, as loções oftálmicas, que são soluções aquosas estéreis, destinadas à lavagem ou banho dos olhos ou para impregnar curativos oculares.

É habitual utilizar o termo *colírio* para “qualquer preparação farmacêutica que se aplique na mucosa ocular”, mas a maioria dos autores tem reservado o termo para as preparações líquidas: soluções e suspensões (Prista, Alves e Morgado, 1995). Contudo, em 1996, os pesquisadores descreveram que a tendência é considerar como *colírio* somente as preparações líquidas administradas sob a forma de gotas.

Mais recentemente, Garcia (2002) descreve que as soluções aquosas utilizadas para lavagem ocular podem ser chamadas também de *colírios*.

Na preparação de um produto oftálmico, vários requisitos devem ser considerados: esterilidade, limpidez, capacidade de tamponamento, pH, tonicidade, viscosidade, estabilidade, conforto, aditivos, embalagens e conservantes. Devido à inter-relação de muitos destes requerimentos, os mesmos devem ser considerados coletivamente: sistema tampão deve ser considerado na tonicidade e conforto;

estabilidade relaciona-se com o pH, sistema de tamponamento e embalagem; esterilização deve ser considerada nos termos de estabilidade e embalagem (Hecht, 2000).

Na formulação destas preparações, pesquisadores devem também levar em conta a biodisponibilidade, o risco de crescimento microbiano, níveis de pH e as etapas de preparação (Ansel e Popovich, 1990, citados por Sandman e Abelson, 2002).

A ação de uma droga depende, entre outros fatores, das características físicas e químicas da droga e a condição fisiológica e patológica do tecido (Ueno, Refojo e Abelson, 1994, citados por Abelson, Gifford e Chapin, 2002). Os fatores que afetam a atividade oftálmica de uma droga foram avaliados por Abelson, Gifford e Chapin (2002). As formulações devem superar as barreiras físicas e químicas dos olhos, como o filme lacrimal, a córnea, a conjuntiva, a retina e outras.

Segundo a *Farmacopeia Europea* (1988), BP (2002) e a Farmacopeia Portuguesa (2002), é permitida a inclusão de excipientes, por exemplo, para ajustar a tonicidade ou viscosidade da preparação ou para ajustar ou estabilizar o pH.

É importante conhecer a composição da medicação ocular, pois, além da droga ativa, existem outros componentes que auxiliam na estabilidade das drogas, na vida de prateleira e tolerabilidade dos pacientes. Entretanto, apesar da necessidade, estes componentes podem causar efeitos adversos em alguns pacientes (Sandman e Abelson, 2002).

As preparações para aplicação oftálmica devem ser manipuladas com o máximo cuidado, devendo apresentar precisão de composição, serem límpidas, isotônicas e possuírem um pH compatível com o líquido lacrimal, além de serem estéreis. A isotonia com o líquido lacrimal é um dos requisitos que as soluções para uso oftálmico devem obedecer, pois, assim, tornam-se menos irritantes (Prista, Alves e Morgado, 1990).

Devido à facilidade da contaminação da água comum ou destilada por *Pseudomonas aeruginosa*, quando mantida em más condições de conservação, é recomendado utilizar água esterilizada em preparações oftálmicas (Prista, Alves e Morgado, 1990, 1996).

A limpidez da solução é função não apenas do processo de fabricação, mas também da limpeza do recipiente e do processo de fechamento. Este processo e o

material da embalagem não devem ceder partículas à solução devido ao contato prolongado, durante a vida de prateleira do produto (Hecht, 2000).

A estabilidade das preparações oftálmicas depende da natureza química da droga, do pH final do produto, do método empregado na fabricação, dos aditivos e do tipo de embalagem. Para avaliar a estabilidade, deve ser considerada a estabilidade química de todos os componentes da formulação (princípio ativo, conservante) e a eficácia do conservante (Hecht, 2000).

Nem sempre estas características são respeitadas, ocasionando lamentáveis acidentes. O farmacêutico deve ter na preparação dos medicamentos oftálmicos pelo menos os mesmos cuidados dispensados à fabricação de injetáveis. Devido à possibilidade de microrganismos invadirem a córnea, “as formas de administração ocular devem ser estéreis” (Prista, Alves e Morgado, 1992).

Preparações contendo ácido bórico podem ser esterilizadas com segurança a 121 °C durante 15 min (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000).

2.5.1 Esterilidade

A esterilidade¹⁴ é requerida para *todos* os produtos de uso oftálmico, independente da forma, substância ou intenção de uso. Este requisito aumentou a similaridade entre as preparações oftálmicas e parenterais (Hecht, 2000).

Em 1953, o *Food and Drug Administration* (FDA) considerou que as preparações oftálmicas não estéreis estavam adulteradas. Contudo, a exigência legal só veio em 1955, quando a Farmacopéia Americana incluiu a esterilidade para as preparações oftálmicas, sendo, então, o primeiro compêndio oficial a exigir tal requisito (Hecht, 2000).

Em 1955, Murphy, Allen e Mangiaracine descreveram a necessidade de medicações oftálmicas serem preparadas assepticamente, esterilizadas e acrescidas de um preservativo antimicrobiano, o qual deve ser compatível com outros componentes da formulação.

Na Inglaterra antes de 1966, não havia regulamento de âmbito nacional que controlasse a produção, apresentação e duração de uso das preparações de drogas oftálmicas (Livingstone, Hanlon e Dyke, 1998). Em conseqüência de vários

¹⁴ Esterilidade é a ausência de microrganismos viáveis (Lachman, Lieberman e Kanig, 2001).

incidentes sérios decorrentes da contaminação microbiana de colírios, foram publicados padrões de prática farmacêutica no *British Pharmaceutical Codex*, exigindo que os colírios fossem, entre outros, estéreis, preparados em um veículo bactericida e fungicida e que, em geral, um recipiente de colírio poderia ser usado durante aproximadamente um mês para propósitos domiciliares (Jolly, 1966 citado por Livingstone, Hanlon e Dyke, 1998). Estas exigências foram subsequentemente refinadas e adotadas pelo Departamento de Saúde e Previdência Social e permanecem em operação até os dias atuais (Livingstone, Hanlon e Dyke, 1998).

A esterilidade é uma das qualidades mais importantes a exigir das soluções para uso oftálmico, tendo em vista os registros de infecções oculares graves, resultantes do uso de colírios contaminados com microrganismos. As farmacopéias determinam que as soluções de uso oftálmico sejam isentas de microrganismos (F. BRAS. IV, 1988; *Farmacopea Europea*, 1988; JP XIV, 2001; Farmacopeia Portuguesa, 2002; BP, 2002; USP 25, 2002). Atualmente, o FDA continua considerando como adulteradas as preparações oftálmicas que não se apresentem estéreis, estando estas sujeitas às penalidades da legislação americana (Prista, Alves e Morgado, 1990).

O requisito da esterilidade é de vital importância no período pré e pós-cirúrgico, quando o paciente envolvido sofreu ferimentos perfurantes do globo ocular, e quando as defesas naturais do organismo estão enfraquecidas, como aquelas encontradas em pacientes imunodeprimidos, com queimaduras, entre outras (Roizenblat e Inomata, 1982).

Possivelmente, a esterilidade seja o critério mais difícil para satisfazer na preparação oftálmica, visto que medicações oftálmicas apresentam-se em embalagens multi-dose, possibilitando que pacientes toquem o bico do frasco na pálpebra, cílio ou conjuntiva, ou ainda, podem entrar em contato com outras superfícies não estéreis. Um único frasco da medicação oftálmica pode ser administrado a vários pacientes em um consultório médico. Devido a estes riscos, são adicionados conservantes para reduzir o risco de contaminação (Sandman e Abelson, 2002).

A BP (2002) e a Farmacopeia Portuguesa (2002) preconizam que as preparações oftálmicas sejam preparadas usando materiais e métodos para manter a esterilidade, evitando-se a introdução de contaminantes e a proliferação de microrganismos.

2.5.2 Conservantes

Além de estéreis, sempre que possível, as soluções oftálmicas, mesmo que esterilizadas durante a fabricação, devem ser acrescidas de um conservante, a fim de garantir a esterilidade durante o tempo de uso do produto (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000) e prevenir a decomposição do princípio ativo e proporcionar atividade antimicrobiana (Noecker, 2001; Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Soluções oftálmicas de dose múltipla correm o risco de serem contaminadas durante o uso, necessitando o acréscimo de conservantes, a fim de que estes destruam os microrganismos introduzidos acidentalmente, assegurando a esterilidade da solução oftálmica (Prista, Alves e Morgado, 1996; Hecht, 2000). A importância de conservantes em preparações oftálmicas acondicionadas em frascos de dose múltipla também foi destacada por Äslund, Olson e Sandell (1978).

As preparações oftálmicas em embalagens para doses múltiplas devem conter conservantes, a menos que a própria preparação possua propriedades antimicrobianas intrínsecas adequadas (*Farmacopeia Europea*, 1988; *Farmacopeia Portuguesa*, 2002; BP, 2002).

A incidência de contaminação microbiana em resíduos de colírios e unguentos oculares, que retornaram à farmácia de um hospital, foi avaliada por Harte, O'Hanrahan e Timoney (1978). Os autores encontraram contaminação em 42,6% das amostras e recomendaram maior flexibilidade na escolha de agentes antimicrobianos ao formular colírios multi-dose. Salientaram que “o uso de soluções oftálmicas sem capacidade auto-esterilizante deveria ser monitorado cuidadosamente”.

Soluções oftálmicas multi-dose sem conservantes devem ser restritas a drogas que tenham atividade antibacteriana intrínseca e, depois de aberto, os frascos devem ser mantidos sob refrigeração e descartados após 7 dias. Entretanto, a refrigeração não é uma proteção absoluta contra a contaminação, pois bactérias mesófilas e psicrófilas podem multiplicar-se na faixa de temperatura de 4 a 8 °C (Wilson, 1996).

Vinte e uma formulações de colírios sem conservantes, em dose múltipla, foram testadas por Oldham e Andrews (1996), para avaliar a preservação antimicrobiana, através do teste de eficácia antimicrobiana descrito em farmacopéia.

Comparou-se o crescimento microbiano das amostras mantidas sob refrigeração com amostras mantidas na temperatura indicada no método utilizado (20 a 35 °C, de acordo com o microrganismo empregado). Constataram uma maior redução de crescimento microbiano nas amostras refrigeradas. Concluíram que as soluções oftálmicas sem conservantes, mantidas sob refrigeração, podem ser utilizadas com segurança por 7 dias. Entretanto, os autores salientaram que vários fatores devem ser considerados, como a situação em que essas soluções são aplicadas (olhos intactos ou lesados), se a administração é realizada em conjunto com terapia antibiótica, entre outras.

Os conservantes permitem que as soluções oftálmicas sejam utilizadas por até um mês após a abertura do frasco (Oldham e Andrews, 1996).

A contaminação microbiana das embalagens de dose múltipla está relacionada com a frequência de uso e do tipo de embalagem utilizada (Prista, Alves e Morgado, 1996).

O uso de conservantes em preparações oftálmicas foi requerido por órgãos regulatórios da Europa e EUA após 1960, quando, na Suécia, pomadas oftálmicas contaminadas com *P. aeruginosa* provocaram danos oculares (Kallings, Ringertz e Silverstolpe, 1966; Wallhäusser, 1976, citado por Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Os conservantes atuam sobre o crescimento, multiplicação e metabolismo dos microrganismos, através de um ou mais mecanismos: modificação da permeabilidade da membrana e extravasamento dos constituintes celulares (lise parcial); lise e extravasamento citoplasmático; coagulação irreversível dos constituintes citoplasmáticos (por exemplo, precipitação de proteínas); inibição do metabolismo celular pela interferência nos sistemas enzimáticos ou inibição da síntese da parede celular; oxidação dos constituintes celulares; e hidrólise. O ácido bórico age, provavelmente, por desnaturação de proteínas (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000).

O conservante utilizado deve ser de ação rápida, impedir o crescimento de microrganismos ou promover sua destruição, nos casos de introdução acidental durante o uso (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000). Possuem a capacidade de eliminar os microrganismos de frascos de colírios em até 24 h, desde que tais microrganismos entrem em contato direto com o conservante. Desta forma, quando a contaminação está localizada na tampa dos frascos isto não acontece (Coad, Osato e Wilhelmus, 1984).

Na seleção do conservante, muitos fatores devem ser considerados, tais como: efetividade para prevenir crescimento microbiano; na concentração usada, não deve afetar a segurança ou o conforto do paciente; e compatibilidade com a formulação (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000). Na formulação, devem ser consideradas a faixa de pH da preparação (para alcançar uma atividade antimicrobiana máxima e sinergismo ou antagonismo na atividade antimicrobiana), a irritação potencial e a compatibilidade com outros componentes (Gangrade et al., 1996 citado por Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Um conservante deve ter ampla atividade antimicrobiana, estabilidade química e térmica, compatibilidade com a embalagem, além de ser inócuo para o tecido ocular (Prista, Alves e Morgado, 1996; Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

O timerosal é um composto organomercurial utilizado nas preparações oftálmicas nas concentrações de 0,005 a 0,02%, com atividade bacteriostática e antimicótica (Hecht, 2000).

Os parabenos (metilparabeno e propilparabeno) são compostos utilizados em preparações oftálmicas usualmente na concentração de 0,1%, com atividade antimicrobiana para leveduras e bactérias Gram positivas, com atividade antimicrobiana ótima na faixa de pH de 4 a 9 (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

O metilparabeno pode ser utilizado na concentração de 0,1 a 0,2% e o propilparabeno a 0,04%. Estes conservantes não possuem ação bacteriostática eficiente e a atividade antimicrobiana é lenta. Produzem irritação e ardência nos olhos. Um grupo de especialistas do FDA, ao avaliarem as drogas de venda livre na oftalmologia, consideraram que os parabenos não são aceitos como conservantes para soluções oftálmicas (Hecht, 2000).

Além da compatibilidade com os demais componentes da formulação, o agente antimicrobiano deve manter sua eficácia até o final da utilização da preparação oftálmica (*Farmacopea Europea*, 1988; *Farmacopeia Portuguesa*, 2002).

Segundo Eriksen (1970), a adição de conservantes em preparações oftálmicas pode ter efeito bactericida ou bacteriostático. A atividade antimicrobiana dos conservantes depende da concentração do conservante, da faixa de pH da preparação oftálmica, do grau de contaminação do produto, entre outros (Eriksen, 1970; Chibret, 1997).

A eficácia do conservante escolhido deve ser demonstrada por autoridade competente. O teste é realizado contra quatro classes importantes de patógenos

para os olhos: cocos Gram positivos (*S. aureus*), bacilos Gram negativos (*P. aeruginosa*), leveduras (*C. albicans*) e fungos (*A. niger*), embora outros microrganismos possam estar contaminando as preparações oftálmicas (JP XIV, 2001; USP 25, 2002; BP, 2002).

Segundo Sandman e Abelson (2002), o FDA desenvolveu um teste de eficácia de conservantes como um padrão mínimo. Neste teste, emprega-se uma concentração padrão (entre 1×10^6 e 1×10^7 /ml) de bactérias como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, e testada contra cada conservante. Durante 4 semanas, os tubos inoculados são incubados a 20 – 25 °C. Os tubos são examinados a intervalos semanais por um mês. Um conservante é considerado eficaz se reduz a concentração de bactéria a 0,1% ou menos da concentração inicial após 2 semanas e mantém ou reduz a concentração de bolores e leveduras para o restante de 2 semanas.

Nem todos os conservantes são apropriados para todas as drogas (Sandman e Abelson, 2002). Algumas incompatibilidades entre substâncias e conservantes utilizados em preparações oftálmicas foram citadas por Furrer, Mayer e Gurny (2002). Entre elas, encontra-se o timerosal, que é incompatível com o ácido bórico.

A BP (2002) determina que as substâncias empregadas como excipientes não devem causar efeitos adversos e nem irritação local excessiva.

Os conservantes presentes nas formulações podem provocar reações alérgicas. A exposição repetida a estes conservantes pode sensibilizar o indivíduo, eventualmente causando uma reação de hipersensibilização, a qual pode ser aumentada ou agravada pela existência concomitante de alergias (Sandman e Abelson, 2002).

Os efeitos citotóxicos dos mesmos devem ser avaliados, especialmente nas terapias de longo-prazo (Noecker, 2001).

Determinadas circunstâncias podem aumentar os efeitos oculares adversos, como a concentração dos conservantes, o uso de lentes de contato, o estado da córnea, frequência de uso, duração do tratamento, dentre outros. A severidade do dano ocular aumenta com a concentração do preservativo usado (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Os conservantes que eliminam ou dificultam o crescimento microbiano podem também interferir no crescimento das células do tecido ocular (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Olhos que sofreram cirurgia podem ser mais sensíveis aos efeitos nocivos de certos conservantes influenciando na permeabilidade da córnea e no processo de cicatrização. Estes efeitos podem ser mais relevantes em pacientes idosos (Baudouin e Lunardo, 1998).

Os conservantes usados após cirurgias podem afetar negativamente o ritmo da cicatrização e interferir com a reepitelização da córnea (Hoffman et al., 1986 citados por Furrer, Mayer e Gurny, 2002). Em certos casos, os conservantes são excluídos ou não são recomendados, como nas soluções oftálmicas que possuem atividade antimicrobiana apropriada (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Os conservantes utilizados nas medicações oftálmicas podem alterar a permeabilidade ocular. Uma droga contendo cloreto de benzalcônio penetra o epitélio corneal mais facilmente, bem como quando há ruptura no epitélio (Burstein, 1989, citado por Abelson, Gifford e Chapin, 2002). O cloreto de benzalcônio pode aumentar a penetração na córnea de algumas drogas por causar separação do epitélio (Sandman e Abelson, 2002).

Na córnea, a toxicidade de conservantes pode ser exercida diretamente pela modificação da integridade anatômica e fisiológica do epitélio ou indiretamente, pela alteração do filme lacrimal (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Ensaio com olhos extraídos de coelho demonstraram o efeito das diferentes concentrações de parabenos. Na concentração de 0,04%, Dormans e Van Logten (1982), citados por Furrer, Mayer e Gurner (2002), com o auxílio de microscopia eletrônica, observaram pequenos vacúolos no endotélio ocular. Na concentração de 0,16%, Weinreb et al. (1986), citados por Furrer, Mayer e Gurner (2002) constataram a formação de grandes vacúolos e ruptura do endotélio ocular. A 0,6%, ocorreu perda das microvilosidades.

A escolha da concentração do conservante depende do pH, do grau de dissociação e outros fatores, como a presença de substâncias com capacidade inerente de conservação. Nas preparações oftálmicas, não deve ser esquecido o conforto do paciente, sendo que o conservante utilizado deve ter propriedade irritante nula ou extremamente baixa. Nas concentrações toleradas pelos tecidos oculares, vários conservantes são ineficazes para algumas cepas de *P. aeruginosa* (Ansel, Popovich e Allen, 2000).

Durante avaliação microbiológica de provadores de sombra em uso, Dawson e Reinhardt (1981) verificaram que a diversidade dos componentes orgânicos e

inorgânicos presentes nas sombras pode servir como substrato nutricional para o crescimento de certos microrganismos, caso o conservante seja ineficaz, inativado ou destruído.

Segundo Furrer, Mayer e Gurny (2002), os conservantes, nas concentrações usuais e em doses frequentemente baixas, utilizados seletivamente nos medicamentos oftálmicos aparentemente não prejudicam os olhos, sendo comprovado por milhares de aplicações diárias em todo o mundo. Prista, Alves e Morgado (1996) descreveram que no homem o conservante permanece pouco tempo no olho, devido à ação das lágrimas e pelo movimento das pálpebras. Os coelhos possuem uma secreção lacrimal menor que a do olho humano e, desta forma, o conservante permanece mais tempo em contato com as células epiteliais, provocando lesões.

O conservante não pode ser utilizado para obter uma solução estéril e nem como um substituto das Boas Práticas de Fabricação e da adoção de procedimentos estéreis (Hecht, 2000; USP 25, 2002).

2.5.3 pH

Órgãos governamentais do México exigem que os colírios não sejam irritantes para os olhos; o pH dos colírios deve estar entre 7,0 e 7,4, sendo que valores abaixo de 6,6 ou acima de 9 causam doenças (Garcia, 2002). Segundo o autor, os colírios não devem interferir com a ação da lisozima das lágrimas, a qual pode ser destruída por traços de ácidos ou álcalis.

O pH lacrimal foi medido em 44 pessoas, diretamente no saco conjuntival, através da imersão da ponta de um microeletrodo combinado de vidro. A faixa normal de pH encontrada foi de 6,5 a 7,6, com o valor médio de 7,0 (Abelson, Udell e Weston, 1981).

O ideal seria que toda medicação oftálmica tivesse pH 7,4, que se encontra próximo ao pH da lágrima. Entretanto, o pH interfere na estabilidade da formulação e algumas medicações são mais estáveis e/ou mais eficazes a níveis de pH diferentes de 7,4, geralmente, inclinando para direção ácida (Sandman e Abelson, 2002).

O pH da solução oftálmica deve ser o mais adequado para promover uma estabilidade ótima para a droga. Quando o pH apropriado for alcançado, adiciona-se

um sistema tampão como borato, fosfato ou bicarbonato, para controlar o pH durante todo o tempo de armazenamento do produto (Hecht, 2000).

As medicações oculares devem ser confortáveis, não causar queimação ou coceira. O nível de conforto de tais formulações é dependente de fatores como pH, tonicidade, viscosidade e integridade do epitélio da córnea (Prista, Alves e Morgado, 1995). Um pH na faixa de 7.2 a 7.4 é considerado ideal para o conforto e é provável que valores fora da faixa de 6 a 8 causem desconforto (Abelson, Gifford e Chapin, 2002).

As soluções oftálmicas aquosas não devem exceder aos valores extremos de 5 e 8,5. Contudo, em certas infecções oculares, o pH da lágrima pode afastar-se do seu valor normal, sendo recomendado para esses casos, a utilização de soluções que corrijam o pH (Prista, Alves e Morgado, 1990, 1995).

A solução de ácido bórico na concentração de 1,9% não provoca sensação desagradável no paciente (Prista, Alves e Morgado, 1996). Um pH ácido não provoca necessariamente um desconforto ao olho do paciente, tornando-se mínimo, se logo após a instilação, o pH global das lágrimas voltar a 7,4 (Hecht, 2000). As lágrimas possuem a capacidade de neutralizar as variações de pH decorrentes da instilação de soluções oftálmicas (Prista, Alves e Morgado, 1995).

É importante que o pH empregado seja confortável para uso humano, pois se a medicação ocular tópica for desconfortável, irá induzir o lacrimejamento, a qual diminuirá o tempo de contato da droga com o olho e, portanto, sua bioequivalência (Sandman e Abelson, 2002). A ação terapêutica de uma droga pode ser influenciada significativamente pelo pH (Prista, Alves e Morgado, 1996; Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000).

O efeito do pH em uma formulação para glaucoma foi investigado por Small et al. (1997), com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade ocular e permitir uma redução clinicamente relevante na dose. Os ensaios foram realizados *in vivo*, utilizando coelhos. Os resultados obtidos indicaram que o aumento do pH da formulação testada (de 7,2 para 8,2) permitiu uma redução de 5 vezes na concentração do princípio ativo, reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos.

A faixa de pH de uma preparação farmacêutica pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos: as bactérias são favorecidas pelos meios ligeiramente alcalinos, enquanto que fungos e leveduras pelo meio ácido. Poucos

microrganismos crescem em ambiente com pH menor que 3 ou superior a 9 (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000).

Os fungos toleram uma ampla faixa de pH, na qual o pH em torno de 5,6 é considerado ótimo para seu desenvolvimento. Os fungos filamentosos podem proliferar na faixa de 1,5 a 11, enquanto as leveduras não toleram pH alcalino (Gompertz et al., 1999a). Para um melhor desenvolvimento, a maioria das bactérias de importância médica requer pH neutro (Barbosa e Torres, 1999).

As preparações farmacêuticas aquosas que possuem pH dentro da variação favorável ao desenvolvimento de microrganismos necessitam do acréscimo de um conservante, em concentração adequada, a fim de evitar a proliferação microbiana.

Além de influenciar no conforto do paciente, na absorção do princípio ativo, na proliferação microbiana, na atividade antimicrobiana dos conservantes, o pH pode influenciar consideravelmente a estabilidade de uma preparação oftálmica (Prista, Alves e Morgado, 1996; Hecht, 2000).

2.5.4 Contaminação Microbiana

Na década de 1930, foi reconhecida a necessidade de controlar as soluções oftálmicas, a fim de evitar contaminações graves (Hecht, 2000).

A contaminação de medicamentos foi considerada por Schein et al. (1992) clinicamente importante, face às conseqüências que isto pode acarretar em pacientes com doença da superfície ocular, favorecendo o desenvolvimento de ceratite bacteriana e endoftalmite. Uma infecção em um olho já debilitado pode ter sérias conseqüências, provocando até mesmo perfuração ocular (Chibret, 1997).

Soluções oftálmicas e soluções para uso em lentes de contato podem constituir uma fonte de infecção para a conjuntiva e córnea, e também de endoftalmite exógena (Klotz et al., 2000).

A utilização de soluções oftálmicas apresentando contaminação microbiana pode gerar lesões oculares, ocasionando úlceras gravíssimas e perda da visão (Prista, Alves e Morgado, 1996; Hecht, 2000).

Além de causar riscos de infecção aos olhos do paciente, a contaminação microbiana pode causar uma deterioração físico-química das soluções oftálmicas, alterando odor, sabor, aspecto e os constituintes (Kallings, Ringertz e Silverstolpe, 1966), o que poderia alterar sua eficácia e, conseqüentemente, comprometer o

sucesso do tratamento médico (Pfister e Burstein, 1976 citado por Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

A contaminação microbiana das soluções oftálmicas pode ocorrer durante a fabricação, sendo a principal fonte de contaminação as matérias-primas (especialmente a água), além do ar, pessoal e embalagem, ou durante a utilização do produto pelo paciente (Coad, Osato e Wilhelmus, 1984; Van Ooteghem, 1995 citado por Furrer, Mayer e Gurny, 2002). Isto é um fator de risco significativo, podendo causar várias complicações ao usuário, como ceratite microbiana (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

Avaliando a utilização da água engarrafada em lentes de contato, Penland e Wilhelmus (1999) descreveram que as bactérias podem causar risco oftálmico. Afirmaram que, no caso de ser utilizada uma água com grande número de microrganismos, os mecanismos de defesa dos olhos podem não ser capazes de eliminar o inóculo, salientando a importância do uso de soluções estéreis para rinsagem e guarda de lentes de contato. Os autores verificaram que bactérias presentes na água engarrafada podem proliferar após o envase, devido à probabilidade da bactéria utilizar o carbono e o nitrogênio disponíveis na água.

As soluções contaminadas usadas nas lentes de contato podem contribuir para o desenvolvimento de úlceras córneas (Adams et al., 1983). Em levantamento realizado por Mondino et al. (1986), verificou-se que quatro pacientes com úlceras córneas, de um grupo de 11 usuários de lentes de contato, tiveram contaminação de seus sistemas de cuidado de lentes: estojos, soluções de limpeza ou gotas oculares.

A contaminação de lentes de contato, estojo para lentes e líquidos de manutenção foi avaliada por Velasco e Bermudez (1996). Para os líquidos de manutenção, registraram uma taxa de contaminação de 63,09%, o que os levou a considerarem uma porcentagem extremamente alta de contaminação para líquidos que deveriam ser estéreis. Diante dos resultados obtidos, suspeitaram que instruções de higiene não tinham sido seguidas para a correta manutenção das lentes de contato, assim como higiene pessoal inadequada (unha suja, falta de banho, etc). Foram detectadas impurezas, levando os pesquisadores a acreditarem que as soluções estavam sendo reutilizadas nos estojos por vários dias ao invés de trocarem os líquidos diariamente, apesar dos usuários negarem este procedimento.

A persistência da contaminação por um longo período pode causar graves problemas para a córnea e conjuntiva. O dano no epitélio da córnea decorrente da

manipulação das lentes de contato, aliado à hipóxia corneal, facilitam a aderência de bactérias nas lesões, contribuindo para o desenvolvimento de infecção na córnea em indivíduos com lentes contaminadas (Velasco e Bermudez, 1996).

Através do estudo realizado, Velasco e Bermudez (1996) concluíram que a contaminação das lentes de contato, estojos e líquidos de manutenção pode ser um fator importante na incidência de úlceras corneas bacterianas nos usuários de lentes de contato, especialmente, nos casos de patógenos virulentos, como *Pseudomonas*.

A contaminação microbiana em 220 medicamentos em uso, de 101 pacientes com doença não microbiana na superfície ocular, foi avaliada por Schein et al. (1992). Foi encontrada uma alta taxa de contaminação destes medicamentos, particularmente com microrganismos Gram negativos potencialmente patogênicos, que não fazem parte da flora conjuntival habitual. Os autores acreditaram que “os medicamentos tópicos provêm o reservatório para contaminação e uma fonte potencial de infecção”. Relataram que não foi possível discriminar se o medicamento ou a conjuntiva foi o primeiro local de contaminação, mas os resultados demonstraram uma relação entre os dois locais. Concluíram que “um ciclo de contaminação entre medicamentos em uso e conjuntiva pode representar um fator de risco importante para ceratite microbiana em pacientes com doença de superfície ocular.”

A presença de microrganismos patogênicos na superfície ocular anormal possibilita o desenvolvimento de infecção ocular séria (Schein et al., 1992). Associado ao risco da contaminação está a condição patológica do hospedeiro (como lesões na córnea, diabete *mellitus*, pacientes debilitados com baixa resistência), assim como o tratamento com esteróides, que podem favorecer a invasão e crescimento de bactérias e fungos (Kallings, Ringertz e Silverstolpe, 1966).

O uso de soluções oftálmicas contaminadas com microrganismos patogênicos pode levar a infecções oculares severas, embora a existência de contaminação bacteriana em colírios durante o manuseio não significa que irá desenvolver uma infecção ocular no usuário (Netto e Pereira, 1998). Vários fatores contribuem para o desenvolvimento da infecção: grau da contaminação; patogenicidade das bactérias envolvidas; frequência de uso do produto; mecanismos de defesa do globo ocular, como presença da flora microbiana própria, filme lacrimal (renovação e escoamento), lisozimas, ação de piscar, integridade da córnea e da conjuntiva,

fagócitos presentes na superfície da córnea (Roizenblat e Inomata, 1982; Lima et al., 1995, citado por Netto e Pereira, 1998).

Segundo Ginsberg (1971), Novak e Taylor descobriram que a fagocitose (um dos mecanismos de defesa primária do corpo contra invasão bacteriana) é inibida por concentrações de ácido bórico acima de 2 % em temperatura de 37 a 40 °C.

Apesar da possibilidade de microrganismos vivos não desenvolverem uma infecção ocular, ao serem eliminados pelos conservantes, juntamente com seus metabólitos, podem desencadear reações adversas (Roizenblat e Inomata, 1982).

Em medicamentos oculares, as bactérias Gram negativas são mais frequentemente isoladas do que as Gram positivas (Furrer, Mayer e Gurny, 2002). Casos catastróficos de gotas de indometacina contaminadas com *P. aeruginosa* provocaram uma epidemia de séria infecção ocular em 17 pacientes, dos quais 2 perderam um olho devido à endoftalmite (Schein et al., 1992).

Segundo Roizenblat e Inomata (1982), há casos de endoftalmite, relatado em literatura, causados por bactérias e fungos, decorrentes do uso de colírios contaminados. Klotz et al. (2000) também relataram que gotas oftálmicas e soluções para lentes de contato podem ser uma fonte de infecção da conjuntiva, da córnea e de endoftalmite exógena. Segundo Schein et al. (1992), em medicamentos contaminados, os conservantes presentes nas formulações não foram eficazes.

O problema de contaminação microbiana dos medicamentos tópicos requer modificações tecnológicas, além de educação e responsabilidade do paciente (Schein et al., 1988). Os autores sugeriram que o local de guarda do medicamento pode facilitar a contaminação do mesmo, bem como o uso prolongado de um frasco.

2.5.5 Embalagens para as Preparações Oftálmicas

Nas preparações oftálmicas, além da esterilidade, preservação, isotonicidade, tamponamento e viscosidade, deve ser considerado o acondicionamento adequado (Ansel, Popovich e Allen Jr., 2000).

O produto deve ser armazenado em condições adequadas, a fim de garantir a sua estabilidade, sendo que as condições de armazenamento devem constar no rótulo do produto (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000).

A escolha da embalagem é muito importante, pois a mesma influencia na conservação da preparação oftálmica, devendo protegê-la da contaminação microbiana (Prista, Alves e Morgado, 1996; Hecht, 2000).

As farmacopéias prescrevem que as preparações oftálmicas sejam também acondicionadas de forma a manter a esterilidade até o momento do uso (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

O recipiente, além de proporcionar estabilidade ao produto, deve permitir a utilização segura e eficaz pelo paciente. No caso das preparações oftálmicas, o acondicionamento deve permitir fácil administração e de forma a manter a esterilidade (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000).

A utilização de recipientes opacos dificulta a detecção de alterações no produto, impedindo a rápida constatação de tais alterações e imediata rejeição do produto (Prista, Alves e Morgado, 1996).

O tipo de frasco empregado (vidro, plástico, claro, opaco, tipo da tampa) influencia na estabilidade química do produto (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000). Os frascos devem ser fabricados com material o mais inerte possível, não interagir com a formulação da preparação oftálmica, procurando proporcionar o isolamento entre o produto e o meio ambiente (Roizenblat e Inomata, 1982). Embalagens plásticas podem conter diversas substâncias estranhas, como agentes liberados na moldagem, antioxidantes, inibidores de reação e outros que podem lixiviar com facilidade do plástico para a solução. A cola utilizada para aderir o rótulo ou a tinta da rotulagem pode penetrar o polietileno e atingir a solução (Hecht, 2000).

Os recipientes devem ser previamente lavados e, a seguir, esterilizados, através de método adequado (Prista, Alves e Morgado, 1996).

A BP (2002) determina que as embalagens devem ser estéreis, lacradas, proteger o produto da luz e que, no caso das loções oftálmicas, não podem conter mais do que 200 ml, a menos que haja justificativa e autorização.

Frascos contendo grandes volumes devem ser evitados, face à possibilidade do conteúdo ser contaminado durante a utilização (Schellini et al., 2000). Em estudo para avaliar a contaminação de 42 frascos de água boricada em uso, Kara José et al. (2003) verificaram que 40,5% dos frascos apresentavam contaminação: 2,4% proveniente do conteúdo líquido, 40,5% da parte interna da tampa e 14,3% da parte interna da borda do frasco, sendo que 58,8% dos frascos contaminados tiveram as tampas manuseadas inadequadamente. Verificaram também que 38,1% dos frascos

havia sido abertos há mais de 1 mês e destes, 31,1% apresentaram contaminação. Nos 26 frascos abertos em menos de 1 mês, o índice de contaminação caiu para 23,1%. Os autores concluíram que houve uma correlação entre o tempo de abertura e a contaminação dos frascos, afirmando que a contaminação dos recipientes é um risco potencial para infecção ocular. Não constataram correlação com os microrganismos encontrados nos frascos e nas conjuntivas dos usuários.

Em estudos com medicamentos antiglaucoma, Geyer et al. (1995) também comprovaram que o prolongamento do período de uso acarreta em aumento na frequência de contaminação. No estudo, verificaram que 19% dos frascos utilizados por até 8 semanas apresentavam contaminação, enquanto 40% estavam contaminados quando utilizados por um período superior.

Em avaliação realizada por Livingstone, Hanlon e Dyke (1998), os pesquisadores verificaram que não havia diferença significativa da incidência de contaminação entre frascos de colírios utilizados por 7 ou 14 dias, em pacientes internados em hospital. Concluíram que não há risco para a saúde dos pacientes ao utilizarem os frascos por 14 dias.

A Farmacopeia Portuguesa (2002) e BP (2002) determinam que o prazo para utilizar a preparação oftálmica após a abertura do frasco deve estar indicada no rótulo, sendo que o prazo máximo é de 4 semanas, exceto quando justificado e autorizado.

2.5.6 Rotulagem

Ansel, Popovich e Allen Jr. (2000) destacaram que o medicamento deve “ser rotulado de modo a promover o uso correto e ser armazenado sob condições que contribuam para um prazo máximo de validade”, acrescentando ainda que este deve ser adequado e que durante a validade espera-se que o produto mantenha sua estabilidade (química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica), nas condições de armazenamento indicadas.

No rótulo devem constar o nome e a concentração dos agentes antimicrobianos e de outras substâncias adicionadas à formulação (*Farmacopeia Europea*, 1988; USP 25, 2002).

No rótulo dos medicamentos sem prescrição devem constar alertas adequados, sempre que o “uso indiscriminado do medicamento possa levar a

complicações graves ou mascarar uma condição mais grave do que aquela para a qual foi prescrito” (Ansel, Popovich e Allen Jr, 2000). Para os medicamentos vendidos diretamente para o leigo, os autores destacaram que nos rótulos devem constar recomendações de uso apenas nos casos em que o produto é eficaz, demonstrado cientificamente. Acrescentaram que as situações graves que não podem ser diagnosticadas ou tratadas com êxito pelo leigo, não devem constar nos rótulos.

Kara José et al. (2003) observaram que a indicação de uso da Água Boricada constantes nos rótulos dos frascos é incompleta e confusa.

Äslund, Olson e Sandell (1978) salientaram que é grande o risco de contaminação das preparações oftálmicas quando utilizadas por pessoas sem experiência, sendo, então, necessárias instruções detalhadas para o manuseio dos frascos.

2.6 MICRORGANISMOS

Em toda superfície exposta ao ambiente podem ser encontradas bactérias e a superfície ocular não é uma exceção. A flora ocular normal inclui espécies de *Haemophilus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, e mais raramente, *Pneumococcus* e *Streptococcus*. Sob circunstâncias normais, estes microrganismos existem pacificamente na superfície ocular sem causar quebra na córnea ou no epitélio conjuntival. Entretanto, ocasionalmente estes microrganismos podem se sobrepor à ação de remoção do filme lacrimal e pálpebras e a atividade da lisozima e dos anticorpos. Com isto, o microrganismo virulento pode reproduzir e prosperar nessas condições. A suscetibilidade do hospedeiro pode estar envolvida devido às deficiências imunológicas, anormalidades da pálpebra, anormalidades do filme lacrimal, ductos de lágrima bloqueados, higienização de lente de contato ou pessoal precárias, ou elementos ambientais (Abelson e McGarr, 1998).

A patogenicidade varia amplamente entre as diferentes espécies e entre cepas da mesma espécie, assim como a suscetibilidade do hospedeiro, que é afetada por muitos fatores, como integridade das barreiras fisiológicas e condições imunológicas. O equilíbrio entre os fatores de virulência dos microrganismos e as defesas do hospedeiro determina se uma infecção inicial irá evoluir (Petersdorf e Root, 1988).

Estudos com bactérias patogênicas têm mostrado que muitos genes requeridos para virulência são regulados em resposta aos sinais do ambiente próprio do nicho do hospedeiro. Esses sinais incluem temperatura, pH, pressão osmótica, concentração de ferro e íons cálcio (Mekalanos, 1992).

As bactérias patogênicas são classificadas em primárias e oportunistas. As primeiras podem causar doenças em indivíduos normais enquanto as oportunistas geralmente só causam doença em indivíduos com mecanismo de defesa deficiente (Trabulsi e Souza, 1999).

A produção de toxinas por microrganismos virulentos resulta na perda da função da retina e os efeitos específicos das toxinas bacterianas nos tecidos e células do segmento posterior não têm sido bem estudados (Callegan et al., 2002).

2.6.1 *Salmonella*

A *Salmonella* pode ser encontrada em vegetais, no solo, na água e na microbiota dos seres humanos e outros animais (Fernandes et al., 2000).

Segundo Cardoso et al. (2000), o gênero *Salmonella* é o mais estudado. Nas inspeções sanitárias, é grande o interesse em torno do diagnóstico, controle e medidas preventivas. Dentro deste gênero, são distinguidas sorologicamente mediante provas bioquímicas, cerca de 2.000 sorotipos de salmonelas, considerados, na atualidade, como patógenos.

O gênero *Salmonella* pode produzir abscessos em quase todos os locais anatômicos (Guerrant, 1988) e quase todas as espécies são potencialmente patogênicas (Tortora e Funke, 2000).

Várias condições contribuem para o desenvolvimento de infecções por este gênero, tais como desnutrição, imunodeficiências, anemia falciforme e transplantes (Fernandes et al., 2000).

2.6.2 Estafilococos

Os estafilococos são amplamente distribuídos na natureza e são encontrados na microbiota da pele e mucosas de humanos (Locksley, 1988; Ferreira e Ávila, 1996; Martins, 1999), que quando encontram uma porta de entrada ou existência de doença de base que predisponha ao desenvolvimento de infecção, tornam-se

bactérias potencialmente patogênicas (Ferreira e Ávila, 1996). São comuns em infecções na pálpebra, na conjuntiva e na córnea (McCulley, Dougherty e Deneau, 1982; Dougherty e McCulley, 1984; Leibowitz, 1991; O'Brien et al., 1995; Hyndiuk et al., 1996).

Os estafilococos estão entre as bactérias patogênicas mais resistentes às condições ambientais, suportando temperaturas de até 50 °C, durante 30 min (Fernandes et al., 2000).

As espécies de *Staphylococcus* são divididas em dois grandes grupos, de acordo com a presença ou ausência de coagulase (enzima que coagula o plasma): coagulase positivo e coagulase negativo (CoNS). Existem cerca de 27 espécies de *Staphylococcus*, algumas delas frequentemente são associadas a diversas infecções oportunistas (Martins, 1999).

O gênero *Staphylococcus* é um dos patógenos comuns nas blefarites, sendo que nos E.U.A., em 95,8% dos pacientes foi isolado o *S. epidermidis* (Kanski, 2000).

Os agentes mais comuns na conjuntivite bacteriana simples são o *S. aureus* e o *S. epidermidis* (Kanski, 2000). Conjuntivites bacterianas, normalmente causadas por *S. aureus*, são mais comuns em crianças (Seewoodhary e Stevens, 1999).

O *S. aureus* pode estar envolvido na infecção das glândulas, dos folículos das pálpebras (terçol) e na blefarite (Mims et al., 1999). Várias enzimas extracelulares e toxinas são secretadas pelo *S. aureus*, muitas das quais têm sido relacionadas à patogenicidade. Produz proteínas, incluindo alfa-toxina e proteína A, que podem contribuir para causar dano ao tecido córneo na ceratite. Resultados de estudos realizados em coelhos sugeriram que a alfa-toxina é um fator de virulência principal em ceratite estafilocócica, o mesmo não ocorrendo com a proteína A (Callegan et al., 1994).

Segundo Locksley (1988), o *S. aureus* é o mais importante patógeno do gênero para o ser humano. É considerado como a causa principal de endoftalmite pós-trauma e pós-operatório (Callegan et al., 2002). Porém, outras espécies possuem capacidade de provocar doenças ao Homem. Callegan et al. (2002) citaram que, nos Estados Unidos, CoNS é responsável por aproximadamente 70% de endoftalmite de cirurgia de catarata, seguido por *S. aureus*, entre outros.

Segundo Dougherty e McCulley (1986), há relatos de CoNS provocar blefarites crônicas, conjuntivites e ceratites. O CoNS tem sido frequentemente isolado de pacientes com conjuntivites bacterianas agudas (Leibowitz, 1991).

Atualmente, estes microrganismos são os mais comuns nos casos de endoftalmites pós-operatórias (Kattan et al. 1991; Speaker et al., 1991).

O *S. epidermidis* já foi considerado oportunista, mas atualmente é tido como patogênico eventual. Este microrganismo pode causar endoftalmite, principalmente quando há ferimentos oculares e baixa resistência do hospedeiro (Lacaz, 1977, citado por Roizenblat e Inomata, 1982). Entre o grupo CoNS, o *S. epidermidis* é o mais virulento (Fernandes et al., 2000).

A identificação no laboratório de microbiologia, frequentemente limita-se à pesquisa de identificação para *S. aureus*, enquanto isolados “não *S. aureus*” simplesmente é informado como espécies de CoNS, face à sua natureza onipresente e virulência relativamente baixa. Entretanto, nos últimos 15 anos ocorreu um aumento nos registros de infecções oculares causadas por CoNS e estas espécies têm recebido pouca atenção na oftalmologia, apesar de serem patógenos importantes. Devido à importância crescente, o CoNS deveria ser identificado ao nível de espécies (Pinna et al., 1999).

2.6.3 *Pseudomonas*

As *Pseudomonas* sobrevivem em ambientes úmidos e estão difundidos na natureza, habitando o solo, a água, as plantas e os animais, inclusive seres humanos (Tortora e Funke, 2000).

É um bacilo Gram negativo, comum no meio ambiente, capaz de infectar todos os tecidos. Age como um patógeno oportunista sob várias circunstâncias, sendo que uma grande variedade de fatores de virulência contribui para sua capacidade de causar infecções (Lyczak, Cannon e Pier, 2000).

Infecções humanas causadas por *P. aeruginosa* foram relatadas pela primeira vez em 1862, por Luke, que observou partículas com formato de bastonetes, em pus de coloração azul esverdeado de algumas infecções, de coloração semelhante a que tinha sido observada por Sedillot em curativos cirúrgicos, cuja coloração é conhecida por ser causado pelo pigmento piocianina produzido pela *P. aeruginosa*. O microorganismo foi primeiramente isolado de infecções em 1882 por Gessard denominando-o de *Bacillus pyocyaneus* (Lyczak, Cannon e Pier, 2000).

Esta bactéria tem exigências nutritivas mínimas e pode tolerar uma grande variedade de circunstâncias físicas (Fernandes et al., 2000; Qarah e Cunha, 2003).

Algumas cepas de *Pseudomonas* podem se desenvolver em temperaturas de refrigerador¹⁵ (Tortora e Funke, 2000).

A *P. aeruginosa* sobrevive mais de 300 dias na água, podendo ser encontrada em soluções aquosas, em água de torneira, desinfetantes, pomadas, colírios e outros medicamentos. Uma característica deste patógeno é a sua resistência aos germicidas, podendo proliferar em soluções de quaternários de amônia, iodo, cloro, PVPI, fenóis, clorexidina (Fernandes et al., 2000; Tortora e Funke, 2000).

A ocorrência onipresente de *P. aeruginosa* no ambiente é devido a vários fatores, incluindo suas habilidades para colonizar múltiplos nichos ambientais e utilizar muitos compostos do ambiente como fontes de energia (Williams e Worsey, 1976).

A patogênese das infecções causadas por este agente é multifatorial e complexa (Stratton e Tausk, 1989; Qarah e Cunha, 2003). A *P. aeruginosa* transformou-se numa causa importante de infecção, em especial, nos pacientes com mecanismos de defesa comprometidos. Raramente provoca doença em pessoas saudáveis (Qarah e Cunha, 2003).

A *P. aeruginosa* não é comum em infecções oculares, é oportunista e as infecções causadas muitas vezes são graves (Sandman e Abelson, 2002). Apesar da *P. aeruginosa* estar difundida no meio ambiente, é rara a ocorrência de doenças em humanos saudáveis. Casos clínicos podem ser associados com o comprometimento de defesa do hospedeiro, como imunossupressão geral em pacientes com AIDS (Franzetti et al., 1992; Kielhofner et al., 1992) ou que recebem quimioterapia (Bendig et al., 1987). O rompimento da função fisiológica normal é um dos fatores para este microrganismo tornar-se virulento, o qual produz várias exotoxinas, que podem ser determinantes na sua virulência (Lyczak, Cannon e Pier, 2000).

A ceratite ulcerativa, em usuários de lentes de contato macias, é uma das três doenças humanas mais informadas relacionadas à *P. aeruginosa*. Ceratite ulcerativa é uma resposta inflamatória de avanço rápido da infecção bacteriana da córnea e tem sido considerada como a doença bacteriana mais destrutiva da córnea (Laibson, 1972 citado por Lyczak, Cannon e Pier, 2000).

Este microrganismo pode ser introduzido nos olhos através de soluções

¹⁵ Segundo a F. BRAS.IV (1988), a temperatura de refrigerador é de 2 a 8 °C.

oftálmicas contaminadas (Mims et al., 1999), pois se multiplica com facilidade nestas soluções, acarretando graves infecções na córnea, que evoluem rapidamente, ocasionando perda da visão em 24 a 48 h (Hecht, 2000; Kanski, 2000).

A *P. aeruginosa* é considerada como a causa mais comum de ceratite bacteriana relacionada com lentes de contato (Penland e Wilhelmus, 1999). O uso de lentes de contato pode provocar a perda da integridade do epitélio da córnea, permitindo a invasão da córnea pela *P. aeruginosa* (Kanski, 2000).

Na ocorrência de pequenos traumas, ocasionados por lentes de contato contaminadas com solução desinfetante, ou por água de torneira utilizada no enxágüe, a *P. aeruginosa* pode provocar infecções na córnea, as quais podem evoluir rapidamente, com perfuração da córnea ou esclera, ocasionando endoftalmite, podendo levar à perda da visão (Fernandes et al., 2000).

O acesso aos olhos ocorre pela contaminação das lentes, estojo de lentes e soluções para cuidado das lentes. No teste regulatório para comercialização de desinfetantes químicos para lentes de contato, somente uma variedade por espécie é testada (Lakkis e Fleiszig, 2001). Verificaram que cepas de *P. aeruginosa* testadas variaram na suscetibilidade frente a desinfetantes químicos para lentes de contato. Os autores questionaram testes regulatórios, estabelecidos pelo FDA, que são executados com apenas uma cepa de cada espécie testada, sendo então questionável a suposição que o comportamento de uma cepa seja representativa do restante. Salientaram, ainda, que os microrganismos utilizados nos testes são todas cepas ATCC, que cresceram sob condições ideais e que cepas de isolados clínicos crescem em ambientes de baixo nutriente, o que provavelmente contribui para estas desenvolverem uma suscetibilidade aos desinfetantes bem diferente das variedades de laboratório. É o mais perigoso contaminante presente nas preparações oftálmicas, pois desenvolve-se rapidamente em diversos meios, neles segregando toxinas e produtos bacterianos. Estes últimos, geralmente, eliminam outros microrganismos presentes no meio, chegando a constituir uma cultura pura de *Pseudomonas* (Prista, Alves e Morgado, 1990, 1996; Hecht, 2000).

Sete casos de ceratite microbiana severa associada com o uso de medicamentos oculares tópicos contaminados foram relatados por Schein et al. (1988), cinco deles provocados por *P. aeruginosa*, gerando uma fonte de preocupação para os pesquisadores. Nenhum dos casos foi relacionado com o uso de lente de contato e em todos os pacientes as culturas da córnea e de vários locais

do frasco do medicamento em uso possuíam o mesmo microrganismo. Citaram que os casos relatados no estudo realizado representaram as primeiras séries nas quais *P. aeruginosa* parecia causar ceratite supurativa através de inoculação direta de medicamentos tópicos.

A *P. aeruginosa* pode afetar muitos sítios anatômicos. Uma solução contaminada com *Pseudomonas* pode dar início a uma úlcera córnea e até endoftalmite, cujas afecções devem ser consideradas como iatrogênicas (Netto e Pereira, 1998; Fernandes et al., 2000).

Este microrganismo pode penetrar a barreira epitelial dos olhos apenas sob condições especiais, como danos no epitélio da córnea, podendo provocar infecção com ulceração e perfuração da córnea, com efeitos devastadores (Smulders et al., 1999).

Em levantamento realizado por Irvine et al. (1992), verificou-se que em 2 (3,8%) de 53 casos de endoftalmite causada por *P. aeruginosa* ocorreu perfuração da úlcera córnea. De acordo com os pesquisadores, uma vez estabelecido, este microrganismo produz um número de toxinas e proteases que causam destruição de células do hospedeiro e secundariamente aumentam a capacidade de invasão do organismo. Este microrganismo produz β -lactamase, a qual torna muitos antibióticos usados ineficazes contra o microrganismo. Embora a *P. aeruginosa* seja seguramente a espécie mais comumente isolada de infecção causada por este gênero, outras espécies são ocasionalmente patógenos oportunistas, e a suscetibilidade antimicrobiana padrão frequentemente difere da *P. aeruginosa* (Joklik et al., 1988, citado por Irvine et al., 1992).

Um teste com *P. aeruginosa* para verificar a eficácia bactericida de colírios, cuja esterilidade é mantida por adição de conservantes, foi descrito por Anderson e Crompton (1967). Verificaram uma variabilidade na destruição do inóculo de *P. aeruginosa*, até mesmo quando conservantes idênticos tinham sido incorporados. Descreveram que a destruição das bactérias é influenciada pelo pH da solução, aumentando quando o pH se afasta da neutralidade. Entretanto, o pH ácido favorece a ação dos conservantes.

2.6.4 *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis*, pertencente à família *Bacillaceae*, é uma bactéria aeróbica formadora de esporos. É amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada no solo, poeira, água e alimentos. Pode contaminar, entre outros, os medicamentos. Esporadicamente, pode causar infecções oculares (Fernandes et al., 2000).

Este microrganismo pode originar graves abscessos quando atinge o humor vítreo (Prista, Alves e Morgado, 1996).

2.6.5 Fungos

A virulência dos fungos é afetada por muitos fatores, como temperatura, pH, fatores de defesa do hospedeiro e pré-disposição genética (Ueda e Fernandes, 2000). A capacidade de aderir às células do hospedeiro e a produção de enzimas que destroem as defesas anatômicas são propriedades fúngicas que auxiliam na invasão tecidual (Thomas, 1994).

As doenças fúngicas passaram a ser um importante problema de saúde (Ferreira e Ávila, 1996). Nos últimos anos, aumentou drasticamente o número de infecções por fungos oportunistas e esta tendência continuará devido ao aumento na população de pacientes imunodeprimidos (que são mais propensos a desenvolver este tipo de infecção) e/ou que fazem uso intenso de uma medicina cada vez mais agressiva, como drogas antibacterianas e imunossupressoras (Veronesi e Focaccia, 1996).

Fungos de baixa virulência, ao encontrar condições favoráveis, como nos casos de comprometimento do sistema imunológico, podem desencadear infecções, chamadas micoses oportunistas. Os gêneros *Aspergillus* e *Candida* figuram entre os fungos oportunistas (Gompertz et al., 1999b), sendo o primeiro o mais comum nas infecções fúngicas desta categoria (Veronesi e Focaccia, 1996).

Ao avaliar a flora fúngica do saco conjuntival, inclusive de conjuntivas saudáveis, Ando e Takatori (1982) afirmaram que sob condições normais, é difícil para um fungo permanecer ou proliferar no saco conjuntival.

Para ocorrer infecção fúngica, é requerida a existência de trauma ou resistência imunológica baixa. Evidências sugeriram que os fungos não invadem a

córnea facilmente, sendo rara a infecção causada por este tipo de microrganismo (Abelson e McGarr, 1998; Foster, 1992).

Entretanto, Klotz et al. (2000), afirmaram que as infecções micóticas nos olhos são comuns, sendo que os pacientes com AIDS podem contrair muitas infecções fúngicas diferentes nos olhos e estruturas adjacentes. Descreveram que mais de 70 espécies representando 40 gêneros de fungos têm provocado ceratite fúngica, incluindo espécies de *Aspergillus*.

Verificou-se que entre 1090 pacientes com suspeita de ceratite microbiana, 42% eram causadas por fungos filamentosos (Leck et al., 2002). Os autores afirmaram que infecções da córnea devido a fungos filamentosos são causas freqüentes de dano córneo em países tropicais em desenvolvimento e são de difícil tratamento. Thomas (1994) afirmou que nos trópicos o *Aspergillus* é uma das espécies comumente encontradas nos casos de ceratite fúngica.

O *Aspergillus* (figura 3) é um fungo filamentoso (Mishra, Mehta e Pal, 2004), sendo provavelmente o grupo de fungos mais comum no meio ambiente. São onipresentes e são encontrados em todo tipo concebível de substrato: terra, restos orgânicos em deterioração, ar atmosférico, entre outros (Ferreira e Ávila, 1996; Leck et al., 2002).

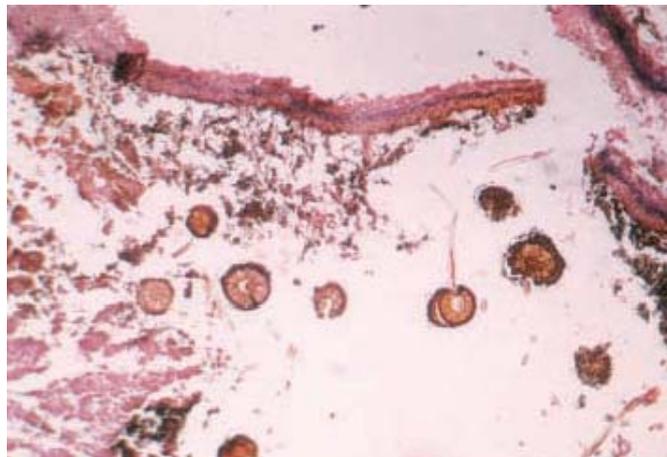


Figura 3 – Fotomicrografia de *Aspergillus niger*, colorido com eosina e hematoxilina.
Fonte: Mishra, Mehta e Pal (2004)

Outro fungo oportunista, a *C. albicans* é uma levedura que faz parte da microbiota humana, existindo como comensal do trato gastrointestinal e genitourinário do homem e de outros animais de sangue quente. Está presente também no meio ambiente, em águas poluídas, nas águas marinhas, no solo, no ar

e nas plantas, normalmente devido a uma contaminação recente por excrementos humanos e animais. “Por este motivo, alguns autores consideram sua presença um indicador de contaminação” (Ferreira e Ávila, 1996).

A *C. albicans* foi considerada por Samaranayake e Lamey (1988) como o patógeno fúngico oral mais freqüentemente isolado no ser humano. É um microrganismo comensal que se comporta como um patógeno sob condições favoráveis (Samaranayake, 1992; Veronesi e Focaccia, 1996).

Fatores locais e sistêmicos podem provocar a invasão do microrganismo. Pacientes com diabetes, neoplasias hematológicas ou imunocomprometidos, são mais suscetíveis às infecções por *Candida*. Alterações na integridade das mucosas podem propiciar acessos para tecidos mais profundos (Bennett, 1988).

Durante décadas, micologistas ficaram intrigados com a conversão de comensalismo para parasitismo (Xu e Samaranayake, 1995). Considerável esforço tem sido direcionado no esclarecimento de características biológicas que contribuem para a habilidade da *C. albicans* provocar doença (Bernardis et al., 1998).

A importância da aderência de *C. albicans* para as estruturas vasculares na patogênese de candidíase disseminada é discutida (Klotz, 1992). A evidência para aderência deste fungo nas células endoteliais e na membrana basal do subendotélio *in vivo* foi revisada pelo autor.

Esta levedura só provoca infecção quando a defesa do hospedeiro é deficiente (Xu e Samaranayake, 1995). Este microrganismo foi isolado de pacientes com úlceras córneas (Killingsworth et al., 1993). A ceratite causada por leveduras como *Candida sp.*¹⁶ quase sempre ocorrem em olhos previamente anormais, como em pacientes com olhos secos, ulceração corneal crônica ou raspagem corneal (Klotz et al., 2000).

Pode causar conjuntivite e dacriocistite crônica¹⁷, a qual pode inflamar-se repentinamente. Em alguns casos, torna-se necessária uma intervenção cirúrgica (Gombos, 1979).

Os fungos podem ser nocivos também para a estabilidade das preparações oftálmicas, causando deterioração das drogas ativas (Hecht, 2000).

¹⁶ A sigla *sp.* significa espécie.

¹⁷ Infecção no saco lacrimal, em decorrência da obstrução do ducto nasolacrimal (GOMBOS, 1979).

2.7 METODOLOGIA

Na sequência, está descrita a fundamentação das metodologias utilizadas para verificar as condições microbiológicas, os parâmetros físico-químicos das amostras e para o teste de eficácia antimicrobiana.

2.7.1 Condições Microbiológicas

Para verificar as condições microbiológicas das amostras, é necessário que sejam utilizadas técnicas assépticas na amostragem e execução dos ensaios, realizando-os preferencialmente em capela de fluxo laminar (F. BRAS. IV, 1988).

Para a detecção, seleção e identificação dos microrganismos presentes nas formulações farmacêuticas, foram empregados métodos de análise adequados e trabalhando-se cuidadosamente com as amostras, a fim de evitar o risco de contaminação acidental das mesmas durante a realização dos ensaios.

A avaliação da contaminação microbiana nas amostras foi realizada para verificar se as mesmas cumprem com as exigências farmacopeicas.

As monografias oficiais determinam que os produtos oftalmológicos devem ser estéreis e, portanto, submetidos ao ensaio de esterilidade. Entretanto, a Água Boricada não é estéril, sendo então submetida aos ensaios para produtos não estéreis: contagem de viáveis totais (bactérias, bolores e leveduras), através do método de contagem em placas e pesquisa de patógenos.

2.7.1.1 Contagem de viáveis totais

A seleção do método é determinada pela natureza do produto a ser analisado e pelo número esperado de microrganismos, o qual deve ser convenientemente validado (F.P., 2002), realizando-se controles positivo e negativo.

O método de contagem em placas é um método geral e pode ser utilizado para a contagem de bactérias, bolores e leveduras. Este método possui como princípio a premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar uma colônia visível e isolada, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado. Muitas vezes, as células microbianas ocorrem em agrupamentos, não

sendo possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. Desta forma, a relação correta é realizada entre o número de colônias e o número de *unidades formadoras de colônias* (UFC), expressando tanto células individuais como grupamentos característicos de microrganismos (Silva, Junqueira e Silveira, 1987).

É importante a escolha do meio de cultura empregado, pois o mesmo deve oferecer condições ideais para a multiplicação dos mais diversos microrganismos (F. BRAS. IV, 1988). Através da variação do tipo de meio (de enriquecimento, seletivo, seletivo-diferencial) e das condições de incubação (temperatura, atmosfera), é possível selecionar o grupo, gênero ou espécie do microrganismo (Silva, Junqueira e Silveira, 1987).

Os meios de cultura devem ser testados para a esterilidade e também para a fertilidade, a fim de comprovar a sua capacidade de promover o crescimento dos microrganismos antes de serem utilizados nos ensaios (F. BRAS. IV, 1988).

No caso de amostras com atividade antimicrobiana, esta deve ser eliminada convenientemente por meio de procedimentos como neutralização, diluição, filtração ou inativação, demonstrando a efetividade da neutralização, empregando-se cepas de microrganismos de referência (F. BRAS. IV, 1988; JP XIV, 2001; Farmacopeia Portuguesa, 2002). Tal atividade deve ser testada antes da execução dos ensaios, a fim de selecionar a metodologia para verificação da presença de substâncias inibitórias do crescimento microbiano, que possam interferir na avaliação microbiológica da amostra. Caso este protocolo não seja cumprido, os componentes presentes na formulação irão inibir o crescimento dos microrganismos possivelmente presentes, quando a amostra for adicionada aos meios de cultura (Prista, Alves e Morgado, 1990).

O metilparabeno¹⁸ é inativado pelo polisorbato 80, formando um complexo com este composto (Prista, Alves e Morgado, 1996).

Condições adequadas para o crescimento de bactérias e fungos (bolores e leveduras) devem ser fornecidas; dentre elas, o meio de crescimento (composição, pH) e a temperatura.

Os fungos desenvolvem-se mais lentamente que as bactérias (Gompertz et al., 1999a), necessitando de um tempo mais prolongado de incubação, em

¹⁸ O metilparabeno é um conservante frequente nas formulações de Água Boricada.

temperatura adequada. O tamanho do inóculo e as condições da cultura influenciam na velocidade de crescimento (Ueda e Fernandes, 2000).

Em geral, os fungos de importância médica são mesófilos, apresentando melhor desenvolvimento na faixa de 20 a 30 °C. Entretanto, a *C. albicans* desenvolve-se melhor na faixa de 33 a 37 °C (Gompertz et al., 1999a).

Os fungos podem ser unicelulares ou multicelulares e são divididos basicamente em filamentosos (bolores, mofos) e leveduras, conforme sua morfologia (Ferreira e Ávila, 1996).

As culturas de mofos apresentam-se como “tufos ou grumos com aspecto de penugem, felpudos ou em algodão na superfície” (Ueda e Fernandes, 2000).

As bactérias possuem diferenças quanto à morfologia (forma, tamanho, estrutura), metabolismo (aeróbico, anaeróbico), necessidades nutritivas e genética (Fernandes et al., 2000), características estas que permitem a identificação desses microrganismos.

A avaliação das colônias presentes no meio sólido é realizada através de exame visual, verificando-se a morfologia e outras características. Esta observação, seguida da coloração de Gram, permite a identificação preliminar das bactérias (Koneman et al., 1993).

O método de coloração de Gram é o mais importante em bacteriologia, utilizado para a identificação de uma grande variedade de microrganismos. Seu mecanismo não é entendido completamente. Baseia-se nas diferenças de parede da célula dos microrganismos classificados como Gram positivos e os classificados como Gram negativos. Os primeiros podem basicamente reter corantes a uma concentração mais alta que espécies Gram negativas. Provavelmente, a diferença mais importante esteja na permeabilidade da parede da célula durante o processo de coloração (Garg e Rao, 1999).

O processo consiste em secar ao ar uma lâmina contendo um esfregaço do microrganismo a ser avaliado, seguido de fixação à quente. Na própria lâmina, pinga-se algumas gotas de solução de cristal violeta, deixando agir por 1 a 2 min. Após enxaguar suavemente em água corrente, adiciona-se gotas de solução de iodo, formando um complexo de tintura-iodo dentro da célula do microrganismo, que é insolúvel em água, mas moderadamente solúvel em acetona ou álcool. A seguir, a lâmina é enxaguada em água corrente e aplicado, como descolorante, álcool etílico ou acetona, por cerca de 2 s. A lâmina, então, é lavada com água corrente. Nesta

etapa, somente os microrganismos Gram positivos retêm o complexo formado, de coloração azul escura, visível ao microscópio, possivelmente devido à parede celular ser menos permeável que a dos Gram negativos. A lâmina, então, é tratada por 1 a 2 min com solução diluída de fucsina e seca ao ar antes de se examinar ao microscópio. O grupo dos microrganismos Gram negativos adquire a coloração vermelha da fucsina (Garg e Rao, 1999).

A caracterização final dos microrganismos pode ser realizada através da detecção de características exclusivas de cada espécie, como sistemas enzimáticos, utilizando-se meios de cultura que contêm substratos específicos e indicadores químicos que detectam alterações de pH ou a presença de subprodutos específicos (Koneman et al., 1993).

2.7.1.2 Pesquisa de patógenos

Os patógenos *S. aureus*, *Salmonella sp.*, *E. coli* e *P. aeruginosa* devem estar ausentes em todos os medicamentos, independente da via de administração (F. BRAS. IV, 1988).

Furrer, Mayer e Gurny (2002) salientaram que os requisitos farmacopeicos não excluem contaminação com outros microrganismos, existindo relatos de frequente contaminação de frascos de colírios com *S. epidermidis* e outras espécies de *Pseudomonas*.

2.7.1.2.1 Estafilococos

Os estafilococos são cocos Gram positivos, pertencentes à família das *Micrococcaceae*, não-móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivos. Os estafilococos observados ao microscópio (amostras coradas) possuem agrupamento típico, em forma de cacho de uva, de onde é derivado o seu nome (do grego *staphyle*-cacho de uvas). As espécies patogênicas podem ser distinguidas das não patogênicas pela capacidade de fermentar a glicose anaerobicamente. Todas as cepas que produzem coagulase são denominadas de *S. aureus*. Esta espécie, ao contrário do estafilococo coagulase negativo, fermenta o manitol, produz DNase e possui atividade bioquímica diferenciada (Locksley, 1988).

As colônias em meio sólido, com exceção de variantes, possuem diâmetro relativamente grande, atingindo 2 a 3 mm após 24 h de incubação a 35°C (Koneman et al., 1993).

Como características diferenciais, pode ser pesquisada a produção de catalase, atividade de citocromo-oxidase, fermentação da glicose e do manitol, produção de coagulase e atividade DNase (Koneman et al., 1993).

A catalase produzida pelo *S. aureus* age sobre o peróxido de hidrogênio, decompondo-o, cuja ação é observada pela efervescência rápida quando se mistura uma ou duas gotas de peróxido de hidrogênio a 3% com uma porção da colônia de estafilococo (Koneman et al., 1993).

A capacidade do *S. aureus* em fermentar o manitol e de reduzir o telúrito a telúrio livre é avaliada para diferenciar esta espécie do *S. epidermidis* (Koneman et al., 1993).

2.7.1.2.2 *Salmonella*

A *Salmonella* é uma bactéria na forma de bacilo Gram negativo, aeróbico, pertencente à família *Salmonelleae* (Fernandes et al., 2000).

Como características diferenciais, podem ser pesquisadas a fermentação da glicose, redução do nitrato, atividade da citocromo-oxidase e descarboxilase ou desidrolase (lisina, ornitina e arginina), produção de sulfeto de hidrogênio, produção de indol, utilização de citrato, reações de vermelho de metila (Koneman et al., 1993).

2.7.1.2.3 *Pseudomonas*

A *Pseudomonas* é um bacilo Gram negativo, aeróbico, pertencente à família *Pseudomonadaceae*. Suportam grandes variações de temperatura, na faixa de 4 a 42 °C (Fernandes et al., 2000).

Como características diferenciais, podem ser pesquisadas a utilização oxidativa ou fermentativa da glicose, crescimento em ágar cetrimide, atividade de citocromo-oxidase, produção de pigmento fluoresceína (Koneman et al., 1993).

A *P. aeruginosa* possui como característica a produção de piocianina, um pigmento azul-esverdeado (Toledo e Trabelsi, 1999).

2.7.1.2.4 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É muito difundida na natureza, integrando a flora normal do trato intestinal do homem e de outros animais. Sua presença na água é um importante indicador de contaminação fecal. Normalmente, é inofensiva, mas certas cepas podem ser patogênicas (Frazier e Westhoff, 2000; Tortora e Funke, 2000).

A *E. coli* não pode ser diferenciada de bactérias Gram negativas pelo método de coloração de Gram, tornando necessária a realização de culturas e testes de identificação apropriados (Schaberg e Turck, 1988).

Para pesquisa e identificação, é utilizado o crescimento em ágar *Mac Conkey*. Como características diferenciais, são pesquisadas: a morfologia da colônia em ágar eosina-cloreto de metiltionínio, a produção do indol, a reação com o reagente de Voges-Proskauer, a utilização do citrato como única fonte de carbono (F. BRAS.IV, 1988).

2.7.2 Parâmetros Físico-Químicos

Nas preparações oftálmicas, é importante avaliar o aspecto da solução, medir o pH e determinar o teor do princípio ativo (Prista, Alves e Morgado, 1996).

2.7.2.1 Aspecto

As soluções oftálmicas devem apresentar-se límpidas e isentas de partículas visíveis a olho nu (Prista, Alves e Morgado, 1996), quando examinadas em condições satisfatórias de visibilidade (*Farmacopea Europea*, 1988; BP, 2002).

2.7.2.2 Determinação de pH

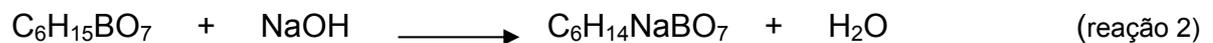
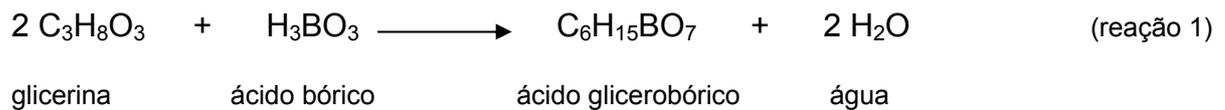
A determinação potenciométrica do pH foi feita com o uso do medidor de pH, através da medição da diferença de potencial entre dois eletrodos adequados, imersos na solução em exame (F. BRAS. IV, 1988).

2.7.2.3 Teor de ácido bórico

A precisão da composição é um requisito imprescindível a ser atendido por todas as preparações farmacêuticas (Prista, Alves e Morgado, 1996).

O teor de ácido bórico foi verificado por titulometria de neutralização/acidimetria, que consiste em neutralizar o ácido (ácido bórico) por uma base (hidróxido de sódio), na presença do indicador fenolftaleína (Korolkovas, 1988).

O ácido bórico forma um complexo com o glicerol (reação 1), o ácido glicerobórico, que é um ácido mais forte que o ácido bórico, sendo, então, neutralizado pelo hidróxido de sódio (Prista e Alves 1973; Parfitt, 1999), conforme reação 2.



2.7.3 Teste de Eficácia Antimicrobiana

Os testes destinados para avaliar a eficácia antimicrobiana objetivam demonstrar a proteção efetiva do conservante utilizado na preparação oftálmica (ou da propriedade intrínseca da solução) contra a introdução acidental de microrganismos na embalagem final (Furrer, Mayer e Gurny, 2002).

A USP 25 (2002) estipula que o teste deve ser executado com *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Torna-se necessário verificar o valor do pH do produto e a concentração do teor de ácido bórico na solução, pois estes dois parâmetros influenciam na avaliação da capacidade antimicrobiana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, estão descritos os materiais e métodos utilizados para a aplicação dos protocolos de investigação, a aquisição das amostras, os equipamentos e instrumentos, os reagentes e soluções, os meios de cultura, os microrganismos de referência, os ensaios analíticos das amostras e o teste de eficácia antimicrobiana.

3.1 PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO

Os protocolos de investigação foram disponibilizados na forma de fichas e os dados foram repassados para uma planilha eletrônica, para facilitar o processamento e os cálculos estatísticos.

3.1.1 Protocolo de Investigação Aplicado à População

No protocolo de investigação aplicado à população, sem restrição de sexo, consta o primeiro nome da pessoa, a naturalidade, o local de residência, a faixa etária, o grau de escolaridade, o conhecimento ou não da Água Boricada, para quem é usada, para qual finalidade utilizou o produto, qual a forma de utilização, local de aplicação, quem indicou, o resultado obtido e comentários.

O modelo do protocolo de investigação aplicado à população está disposto na tabela 1. Para algumas perguntas, foram disponibilizadas respostas na forma de múltipla escolha, a fim de facilitar o preenchimento do questionário e também os cálculos estatísticos. Porém, em alguns casos, este procedimento não foi adotado, objetivando evitar o direcionamento da resposta.

Os questionários foram aplicados nas ruas da cidade de Curitiba, para 115 pessoas, no período de julho de 2003 a agosto de 2004.

Tabela 1 – Modelo do protocolo de investigação aplicado à população.

1. NOME: _____ 2. NATURAL DE: _____
 (1º nome) (Cidade/U.F.)

3. RESIDENTE EM: _____
 (Cidade/U.F.)

4. FAIXA ETÁRIA: () Até 20 anos () 21 – 30 anos () 31 – 40 anos () 41 – 50 anos
 () Acima de 50 anos

5. GRAU DE ESCOLARIDADE: () 1.º Grau incompleto () 1.º Grau completo
 () 2.º Grau incompleto () 2.º Grau completo () Nível superior incompleto
 () Nível superior completo () Outro _____

6. CONHECE ÁGUA BORICADA ? () SIM () NÃO (fim)

7. SABE PARA QUÊ É USADA? () SIM () NÃO (fim)

8. PARA QUÊ? _____

9. JÁ UTILIZOU ? () SIM () NÃO (fim)

10. PARA QUÊ? _____

11. FORMA DE UTILIZAÇÃO: () Compressa () Lavagem () Outro _____

12. LOCAL DE APLICAÇÃO: () Olhos () Ferimentos () Lentes de contato
 () Seios () Outro _____

13. QUEM INDICOU? () Farmácia () Médico () Parente () Outro _____

14. OBTVEVE O RESULTADO ESPERADO? () SIM () NÃO () NÃO SEI

15. COMENTÁRIOS: _____

DATA: ____/____/____

3.1.2 Protocolo de Investigação Aplicado nas Farmácias e Drogarias

Para as farmácias e drogarias, foi perguntado se vendem ou não Água Boricada (em caso negativo, explicando o motivo), se compram sempre da mesma marca e o motivo, qual a média de venda mensal, como se efetiva a venda (indicação, receita médica ou a pedido do cliente), se algum fator influencia na venda do produto (ação terapêutica, baixo preço, outro ou nenhum) e comentários.

Neste protocolo, consta a caracterização do estabelecimento farmacêutico (individualizado, permissionário¹⁹ ou unidade de rede), quem respondeu às perguntas (farmacêutico, atendente ou proprietário) e a data em que o mesmo foi aplicado.

Entre as 750 farmácias e drogarias existentes na cidade de Curitiba²⁰, foram selecionados aleatoriamente 84 estabelecimentos. O protocolo de investigação (tabela 2) foi aplicado pessoalmente ou por telefone, no período de janeiro a julho de 2004.

Tabela 2 – Modelo do protocolo de investigação aplicado em farmácias e drogarias.

-
1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTABELECIMENTO FARMACÊUTICO:
 INDIVIDUALIZADO PERMISSIONÁRIO UNIDADE DE REDE
 2. VENDE ÁGUA BORICADA? SIM (Continua n.º 4) NÃO (Continua n.º 3)
 3. POR QUÊ? _____(fim)
 4. COMPRA SEMPRE DA MESMA MARCA? SIM NÃO
 POR QUÊ? _____
 5. QUAL A VENDA MENSAL (MÉDIA)? _____
 6. COMO SE DÁ A VENDA (PRINCIPAL)?
 INDICAÇÃO RECEITA MÉDICA À PEDIDO DO CLIENTE
 7. ALGUM FATOR INFLUENCIA NA VENDA DO PRODUTO?
 AÇÃO TERAPÊUTICA BAIXO PREÇO NENHUM OUTRO _____
 8. COMENTÁRIOS: _____
 9. QUEM RESPONDEU O QUESTIONÁRIO:
 FARMACÊUTICO ATENDENTE PROPRIETÁRIO
- DATA: ____/____/2004
-

3.2 AMOSTRAS

Vinte e sete amostras de Água Boricada foram adquiridas em farmácias e drogarias dos Estados de Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul,

¹⁹ Permissionário é aquele que possui permissão para utilizar uma determinada marca.

²⁰ Segundo informações do Conselho Regional de Farmácia do Estado do Paraná.

Paraná, Santa Catarina e São Paulo. Também foram coletadas 20 amostras pelas Vigilâncias Sanitárias Municipais e Estadual do Paraná, em farmácias e distribuidoras de medicamentos do Estado.

Um total de 47 amostras foi analisado, todas elas dentro do prazo de validade especificado no rótulo dos produtos, de 25 fabricantes localizados nos Estados de São Paulo (8), Rio de Janeiro (5), Santa Catarina (3), Minas Gerais (3), Paraná (2), Rio Grande do Sul (2) e Goiás (2), conforme mostrado na figura 4.

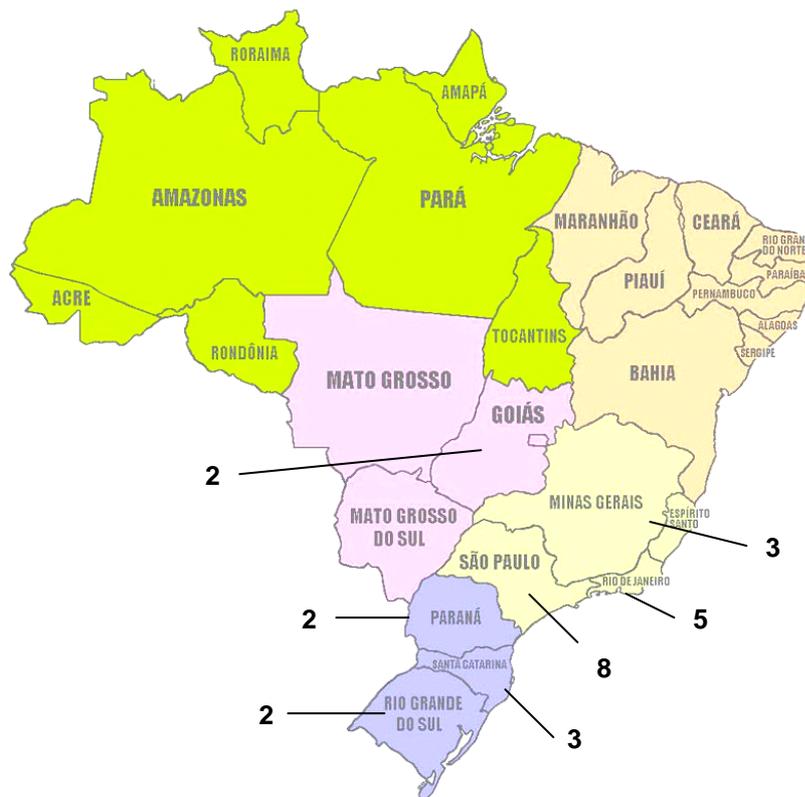


Figura 4 – Distribuição dos fabricantes de Água Boricada em alguns Estados do Brasil.
Fonte: Biblioteca Virtual (2005)

Os fabricantes foram codificados pela letra “F”, seguido de um algarismo romano. Na tabela 3, estão relacionadas as amostras com os fabricantes e o Estado onde os mesmos estão localizados.

Tabela 3 – Relação dos fabricantes de Água Boricada, Estados e amostras.

FABRICANTE	ESTADO	AMOSTRAS
F1	SP	7, 16 e 33
F2	MG	17, 18, 19 e 23
F3	SC	9, 14, 20, 22, 38, 41, 43, 44 e 45
F4	GO	37
F5	PR	21 e 31
F6	PR	6
F7	RJ	4
F8	SP	11, 12 e 13
F9	MG	25 e 30
F10	RJ	8
F11	SP	26 e 29
F12	MG	40
F13	RS	32
F14	SC	42
F15	SP	35
F16	RJ	3
F17	SP	1
F18	RS	15 e 24
F19	RJ	5 e 36
F20	SP	27
F21	SC	10
F22	RJ	28 e 46
F23	GO	34
F24	SP	39 e 47
F25	SP	2

3.3 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS

No desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizados os equipamentos e instrumentos pertencentes às Seções de Medicamentos, Microbiologia de Alimentos, Esterilização, Meio de Culturas e Reativos do Laboratório Central do Estado do Paraná, relacionados na sequência.

3.3.1 Ensaio Físico-Químicos

Os equipamentos e instrumentos utilizados nos ensaios físico-químicos das amostras estão relacionados na tabela 4.

Tabela 4 – Relação dos equipamentos e instrumentos utilizados nos ensaios físico-químicos.

EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS	UTILIZAÇÃO
BALANÇA ANALÍTICA Marca SARTORIUS	Preparo de soluções
MEDIDOR DE pH Marca METTLER TOLEDO MP220	Ensaio de pH
DESTILADOR DE ÁGUA Marca FANEM	Purificação da água potável
PIPETADOR MANUAL Marca Brand	Amostragem

3.3.2 Ensaio Microbiológicos

Os equipamentos e instrumentos utilizados nos ensaios microbiológicos das amostras e validação das metodologias e o emprego de cada um estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 – Relação dos equipamentos e instrumentos utilizados nos ensaios microbiológicos.

EQUIPAMENTO/ INSTRUMENTO	EMPREGO
AUTOCLAVE VERTICAL Marca Fabbe-Primar Mod. 11034	Esterilização e descontaminação dos meios de cultura, vidrarias e outros materiais.
BALANÇA DE PRECISÃO Marca Libror, Mod. AC 100	Preparo dos meios de cultura
BANHO – MARIA Marca Alpha MOD B45	Preparo dos meios de cultura
BANHO-MARIA COM AGITAÇÃO Marca Marconi Mod. Ma 159	Preparo dos meios de cultura
CÂMARA DE UV Marca Camag	Leitura das colônias de microrganismos
CONTADOR DE COLÔNIAS Marca Phoenix Mod. EC 550 – A	Contagem das UFC nas placas
DEIONIZADOR DE ÁGUA Marca PERMUTION	Purificação da água potável
DESTILADOR DE ÁGUA Marca FANEM	Purificação da água potável
ESTUFA BACTERIOLÓGICA Marca Fanem Mod. 002 CB Marca Quimis Mod. 316 B24	Incubação das amostras e das cepas
ESTUFA INCUBADORA BOD Marca Marconi Mod. MA 415/S	Incubação das amostras e das cepas
FLUXO LAMINAR Marca Trox Mod FLV Série 510 Marca Veco Mod. HL F 518	Preparo das cepas de microrganismos e inoculação das amostras
FOGAREIRO ELÉTRICO 6 bocas Marca Prodicil Mod 06	Preparo dos meios de cultura
FREEZER HORIZONTAL Marca Consul Mod. 415	Guarda das cepas de microrganismos
GELADEIRA DE QUATRO PORTAS Marca Eicon Mod. BKA	Guarda dos meios de cultura
MEDIDOR DE pH Marca METTLER TOLEDO MP220	Preparo dos meios de cultura
MICROSCÓPIO ÓTICO Marca Olympus	Observação das colônias de microrganismos
PIPETADOR AUTOMÁTICO Marca Brand	Amostragem

3.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a execução dos ensaios analíticos, foram utilizados os reagentes e soluções ilustrados na tabela 6.

Tabela 6 – Relação dos reagentes e soluções utilizados nos ensaios analíticos.

REAGENTE/ SOLUÇÃO	UTILIZAÇÃO
Fenolftaleína SI ²¹	Teor de ácido bórico
Glicerina p.a. ²²	Teor de ácido bórico
Solução cloreto de sódio 0,9% (fisiológica)	Teste de eficácia antimicrobiana
Solução hidróxido de sódio 1 N ²³	Teor de ácido bórico
Solução tampão pH 4,00	Calibração do medidor de pH
Solução tampão pH 7,00	Calibração do medidor de pH

3.5 MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA

Os microrganismos de referência utilizados para a verificação da capacidade inibitória das amostras, nos controles dos meios de cultura e no ensaio para avaliação da atividade antimicrobiana da Água Boricada, foram cepas liofilizadas de *Aspergillus niger* ATCC²⁴ 16404, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231, *Salmonella sp.* ATCC 14028 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, fornecidas pelo Instituto de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

3.6 MEIOS DE CULTURA

Para a execução dos ensaios microbiológicos, foram utilizados meios de culturas formulados e disponíveis comercialmente. Os meios foram obtidos na forma desidratada e preparados conforme indicação do fabricante. A relação dos meios de

²¹ A sigla SI significa solução indicadora.

²² A sigla p.a. significa para análise.

²³ A sigla N refere-se à normalidade da solução. Esta solução foi adquirida pronta (marca Merck), com fator de correção igual a 1,0000.

²⁴ A sigla ATCC significa *American Type Culture Collection*.

cultura utilizados está disposta na tabela 7 e a composição dos mesmos é mostrada no anexo 1.

Os meios de cultura foram previamente testados, quanto à sua capacidade seletiva e nutritiva, conforme metodologias estabelecidas pela F. BRAS. IV, 1988.

Tabela 7 – Relação dos meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos.

MEIO DE CULTURA	UTILIZAÇÃO
Ágar Caseína de Soja	Verificação da capacidade inibitória Contagem de bactérias Teste de eficácia antimicrobiana
Ágar cetrimida	Pesquisa de <i>Pseudomonas</i>
Ágar de Vogel-Johnson	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i>
Ágar Mac Conkey	Pesquisa de <i>E. coli</i>
Ágar nutriente	Preparo de inóculo
Ágar Sabourand Dextrose	Verificação da capacidade inibitória Contagem de bolores e leveduras Teste de eficácia antimicrobiana
Ágar verde brilhante	Pesquisa de <i>Salmonella</i>
Caldo de caseína de soja	Verificação da capacidade inibitória
Caldo de enriquecimento	Pesquisa de patógenos
Caldo Lethen	Diluição das amostras

3.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NAS AMOSTRAS

Após a chegada ao laboratório, as amostras foram cuidadosamente inspecionadas, a fim de detectar possíveis irregularidades em suas embalagens. A seguir, foram estocadas à temperatura ambiente até o início das análises, seguindo as recomendações dos fabricantes descritas nos rótulos dos produtos.

As amostras foram submetidas primeiramente à avaliação da embalagem e rotulagem e, posteriormente, aos ensaios microbiológicos e físico-químicos.

3.7.1 Avaliação da Embalagem

As embalagens das amostras foram avaliadas quanto ao tipo de material utilizado (vidro, plástico), coloração do frasco, presença ou ausência de lacre e a apresentação de volume.

3.7.2 Avaliação da Rotulagem

Na avaliação da rotulagem, foram verificados os prazos de validade das amostras, a formulação (tipo de água utilizada, concentração de ácido bórico, presença ou ausência de conservante), presença de indicações do produto para uso oftalmológico e de outras informações relevantes para o consumidor.

3.7.3 Ensaio Microbiológicos

As metodologias analíticas utilizadas para os ensaios microbiológicos, constam em diversas monografias oficiais, sendo que neste trabalho foram empregados os métodos descritos na F. BRAS. IV. (1988).

Todas as vidrarias, meios de cultura e soluções foram previamente esterilizadas. Foram feitos controles positivos e negativos de todos os meios de cultura, em paralelo com a realização dos ensaios nas amostras.

As amostras foram manipuladas cuidadosamente para evitar a contaminação e, conseqüentemente, a obtenção de resultado falso positivo. Para tanto, antes da abertura, as embalagens das amostras foram desinfetadas com álcool etílico 70 % (p/v). Para a amostragem e execução das análises, foram empregadas técnicas assépticas, as quais foram realizadas em fluxo laminar vertical, segundo recomendações da F. BRAS. IV. (1988).

As diluições das amostras foram utilizadas logo após o preparo, não excedendo o tempo de 60 min, conforme recomendações da monografia (JP XIV, 2001).

Antes do início dos ensaios microbiológicos (contagem de viáveis totais, pesquisa e identificação de patógenos), as amostras foram submetidas a teste para

verificação da capacidade inibitória do crescimento microbiano, conforme metodologia descrita na sequência.

3.7.3.1 Verificação da capacidade inibitória

O método consistiu em inocular uma suspensão de microrganismos de referência em placa de Petri contendo a amostra e ágar caseína-soja e incubado em temperatura e tempo adequados para cada microrganismo.

3.7.3.1.1 Preparo do inóculo

Inicialmente, as cepas dos microrganismos utilizados (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella sp.* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Candida albicans* ATCC 10231) foram reidratadas de acordo com as instruções que acompanharam as mesmas.

A seguir, todas as cepas foram conferidas quanto à pureza (crescimento em meios específicos) e quanto à identidade, através de provas bioquímicas.

Após reidratação dos microrganismos, foi realizado um cultivo em meio ágar nutriente (para bactérias) e em ágar Sabourand Dextrose (para bolores e leveduras). As culturas foram incubadas à 30 – 35°C por 24 h, com exceção da *C. albicans*, que foi incubada à 20 – 25°C por 48 h.

A seguir, foram feitas diluições decimais de cada uma dessas culturas, utilizando solução fisiológica, de modo a obter uma suspensão que contenha cerca de 100 células viáveis por ml.

3.7.3.1.2 Preparo da amostra

Foi medido 10 ml da amostra e transferido para Erlenmeyer contendo 90 ml de caldo de caseína de soja e homogeneizado completamente por agitação (diluição 10^{-1}).

3.7.3.1.3 Procedimento para avaliação e inativação da atividade inibitória

Alíquotas de 1 ml da amostra diluída foram transferidas para placas de Petri, medindo 100 x 20 mm (duas para cada microrganismo). A seguir, foi adicionado 1 ml da suspensão do microrganismo (contendo cerca de 100 células viáveis/ml) e 15 a 20 ml de meio ágar caseína-soja (para bactérias) e ágar Sabourand Dextrose (para bolores e leveduras).

Foram preparadas duas placas para cada cepa de microrganismo sem a amostra, para servir de controle. As placas foram incubadas a 30 – 35°C por 48 h, com exceção dos ensaios frente à *C. albicans*, que foram incubados à 20 – 25°C por 5 dias. O crescimento parcial dos microrganismos na amostra indicou a presença de substâncias inibidoras.

A atividade inibitória foi eliminada com a utilização do Caldo Letheen para a diluição das amostras, o qual possui em sua composição substâncias inativadoras (polisorbato 80 e lecitina de soja).

A eliminação da atividade inibitória foi comprovada através da repetição do ensaio descrito e obtenção do crescimento das cepas dos microrganismos utilizados.

3.7.3.2 Contagem de viáveis totais

Para a contagem de viáveis totais, foram executados dois ensaios: um para a detecção e contagem de bolores e leveduras e outro para a detecção e contagem de bactérias mesófilas.

O método utilizado foi o de contagem em placas, seguindo metodologia estabelecida pela F. BRAS. IV (1988).

3.7.3.2.1 Contagem de bolores e leveduras

Uma alíquota de 10 ml da amostra foi adicionada a 90 ml de Caldo Leethen e homogeneizada completamente por agitação (diluição 10^{-1}). Foram preparadas diluições decimais 10^{-2} e 10^{-3} , utilizando o mesmo meio de cultura.

A seguir, alíquotas de 1 ml de cada diluição da amostra foram transferidas para duas placas de Petri, medindo 100 x 20mm, e adicionados 15 – 20 ml de meio ágar Sabourand Dextrose, liquefeito a 45°C.

O conteúdo das placas foi homogeneizado manualmente, através de movimentos rotatórios. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 25°C durante 7 dias.

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se à contagem do número de colônias nas placas com até 100 colônias de fungos utilizando contador de colônias. Foi calculada a média aritmética de cada diluição a partir dos valores obtidos das placas. O número de microrganismos por mililitro foi calculado empregando a equação 1. O resultado foi expresso como Unidade Formadora de Colônias por mililitro da amostra (UFC/ml).

$$N = \frac{(P1 + P2) D}{2} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: N = número de UFC/ ml de amostra
 P1 = número de colônias na placa 1
 P2 = número de colônias na placa 2
 D = diluição utilizada

No caso das placas de todas as diluições que não apresentaram crescimento microbiano, o resultado foi expresso como sendo menor que uma vez a menor diluição (< 10 UFC/ml).

3.7.3.2.2 Contagem de bactérias mesófilas

As amostras foram diluídas da mesma forma como descrito no item 3.7.3.2.1. A seguir, alíquotas de 1 ml de cada diluição da amostra foram transferidas para 2 placas de Petri, medindo 100 x 20mm, e adicionados 15 – 20 ml de meio ágar caseína de soja, liquefeito a 45°C.

O conteúdo das placas foi homogeneizado manualmente através de movimentos rotatórios. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 35°C, durante 4 dias.

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se à contagem do número de colônias nas placas com até 300 colônias de bactérias, utilizando contador de

colônias. Calculou-se a média aritmética de cada diluição, a partir dos valores obtidos das placas. O número de microrganismos por mililitro foi calculado empregando a equação 1. O resultado foi expresso como Unidade Formadora de Colônias por mililitro da amostra (UFC/ml).

No caso das placas de todas as diluições que não apresentaram crescimento microbiano, o resultado foi expresso como sendo menor que uma vez a menor diluição (< 10 UFC/ml).

3.7.3.3 Pesquisa de patógenos

Os seguintes patógenos foram pesquisados: *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *E. coli*.

As metodologias adotadas serviram para a detecção de presença ou ausência dos patógenos relacionados, em 1 g da amostra, seguindo metodologias oficiais estabelecidas pela F. BRAS. IV (1988).

Uma alíquota de 10 ml de uma diluição 10^{-1} da amostra (com caldo Letheen) foi adicionada a 100 ml de caldo de enriquecimento. A incubação foi realizada entre 30 e 35 °C, durante 48h.

Os ensaios descritos na sequência foram realizados a partir do crescimento dos microrganismos no caldo de enriquecimento.

3.7.3.3.1 Pesquisa e Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Para a pesquisa e identificação de *P. aeruginosa*, uma alçada do meio de enriquecimento foi transferida para placa de Petri contendo meio ágar ceftrimida e semeado utilizando o método de estrias em superfície. A placa foi incubada a 35°C durante 24 – 48 h. Havendo o crescimento de colônias suspeitas, realizam-se testes de confirmação, seguindo metodologias estabelecidas na F. BRAS. IV (1988).

3.7.3.3.2 Pesquisa e identificação de *Staphylococcus aureus*

Para pesquisa e identificação de *S. aureus*, transferiu-se uma alçada do crescimento do caldo de enriquecimento para placa de Petri contendo meio ágar de Vogel-Johnson, e semeado utilizando o método de estrias em superfície. A placa foi

incubada a 35°C durante 24 – 48 h. Havendo o crescimento de colônias pretas, brilhantes, circundadas por uma zona amarela, torna-se necessária a realização de testes de confirmação, seguindo metodologias estabelecidas na F. BRAS. IV (1988).

3.7.3.3.3 Pesquisa e Identificação de *Salmonella sp.*

Na pesquisa e identificação de *Salmonella sp.*, uma alçada do crescimento no meio de enriquecimento foi transferida para placa de Petri contendo ágar verde brilhante. A placa foi incubada a 35°C durante 24 – 48 h. Ocorrendo a formação de colônias grandes, vermelhas ou rosas, com halo avermelhado, torna-se necessária a realização de testes de confirmação, seguindo metodologias estabelecidas na F. BRAS. IV (1988).

3.7.3.3.4 Pesquisa e Identificação de *Escherichia coli*

Na pesquisa e identificação de *E. coli*, uma alçada do meio de enriquecimento foi transferida para placa de Petri contendo meio ágar *Mac Conkey* e semeado utilizando o método de estrias em superfície. As placas foram incubadas a 35°C durante 24-48 h. Ocorrendo o crescimento de colônias de coloração vermelha tijolo, circundadas por um halo de precipitação, torna-se necessária a execução de testes de confirmação, seguindo metodologias estabelecidas na F. BRAS. IV (1988).

3.7.4 Ensaios Físico-Químicos

As amostras foram avaliadas quanto ao aspecto, pH da solução e teor de ácido bórico.

3.7.4.1 Aspecto

O aspecto das amostras foi observado a olho nu, quanto à limpidez, ausência de material estranho e coloração.

As soluções oftálmicas devem ser límpidas e isentas de partículas estranhas (Hecht, 2000).

3.7.4.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi executada pelo método potenciométrico, utilizando medidor de pH, seguindo metodologia descrita no item V.2.19, da F. BRAS. IV (1988).

Para a calibração do instrumento, foram empregadas soluções-tampão pH 4,0 e 7,0, visando a calibração do aparelho e a obtenção de linearidade nas respostas em relação às alterações de potencial observadas (F. BRAS. IV, 1988).

Após a calibração do medidor de pH, o eletrodo foi imerso na amostra e realizadas três leituras sucessivas.

O resultado da determinação do pH de cada amostra foi expresso como a média das duas últimas leituras.

3.7.4.3 Teor de Ácido Bórico

A metodologia empregada para este ensaio baseia-se na monografia para o ácido bórico, constante na F. BRAS. II (1959), com adaptações para a Água Boricada: misturou-se exatamente 20 ml de água boricada com 30 ml de glicerina, previamente neutralizada em presença de fenolftaleína (SI). Após homogeneização, titulou-se com solução de Hidróxido de Sódio 1 N (SV), usando fenolftaleína (SI) como indicador. Cada 1 ml de solução gasta de NaOH 1 N equivale a 0,06184 g de H₃BO₃. Os cálculos foram executados de acordo com as equações 2 e 3.

Os resultados para o teor de ácido bórico em cada amostra foram registrados como a média de quatro determinações e o limite de confiança de 95%.

$$g\% = \frac{V.G. \times f.c. \times 0,06184 \times 100}{T.A.} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

g% = relação percentual da quantidade de ácido bórico (em gramas) na solução (em 100 ml)

V.G. = Volume gasto na titulação (em ml)

f.c. = Fator de correção do titulante (NaOH 1 N)

T.A. = Tomada de amostra (em ml)

$$\%d.d. = \frac{g\% \times 100}{V.N.} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

%d.d. = porcentagem do valor nominal declarado

g% = quantidade de ácido bórico (g) em 100 ml da solução

V.N. = valor nominal declarado de ácido bórico

3.8 TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA

Para avaliar a eficácia antimicrobiana, foram preparadas em laboratório duas amostras de Água Boricada a 3%, empregando água purificada obtida por diferentes processos de obtenção: por destilação e deionização. Os valores de pH e condutividade das águas destilada e deionizada foram verificados imediatamente após o processo de purificação (tabela 8).

As amostras foram preparadas conforme indicado na 1ª Edição da Farmacopéia Brasileira (Silva, 1926) para a obtenção da Água Boricada. Uma das amostras foi preparada com água destilada (amostra A) e a outra utilizando água deionizada (amostra B).

A seguir, verificou-se o pH das duas amostras (tabela 8) e cada uma delas foi dividida em duas partes iguais. Uma porção de cada amostra teve o pH ajustado para 7,00, com auxílio de solução diluída de hidróxido de sódio, sendo estas porções identificadas como amostras C e D.

Tabela 8 – Características das amostras de Água Boricada produzidas em laboratório.

AMOSTRA	CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA UTILIZADA	pH DA PREPARAÇÃO
A	Destilada (pH 6,10, condutividade 0,22 µS/cm)	4,37
B	Deionizada (pH 6,06, condutividade 0,49 µS/cm)	4,28
C	Destilada (pH 6,10, condutividade 0,22 µS/cm)	7,00
D	Deionizada (pH 6,06, condutividade 0,49 µS/cm)	7,00

As amostras (figura 5) foram submetidas ao teste de eficácia antimicrobiana, seguindo a metodologia descrita na USP 25 (2002) e utilizando inóculo das cepas dos seguintes microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Além dos microrganismos determinados pela monografia, as amostras foram testadas frente à cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



Figura 5 – Fotografia das amostras de Água Boricada produzidas em laboratório.

3.8.1 Preparo do Inóculo

Inicialmente, as cepas liofilizadas de cada microrganismo foram reidratadas, seguindo a recomendação do fornecedor. A seguir, efetuou-se a reativação das culturas em meios apropriados em tubo inclinado, seguindo o estabelecido na tabela 9.

As superfícies de crescimento das culturas bacterianas e da *C. albicans* foram lavadas com salina estéril, enquanto que para a cultura de *A. niger* utilizou-se salina estéril acrescida de 0,05% de polisorbato 80. A 1ml da suspensão obtida de cada microrganismo foi adicionada quantidade suficiente de salina estéril até obter uma contagem de cerca de 10^8 UFC/ml.

O número de UFC/ml em cada suspensão foi determinado usando as condições do meio e o tempo de incubação para recuperação microbiana listado na tabela 9 para confirmar a UFC/ml inicial estimada.

Tabela 9 – Requisitos para reativação dos microrganismos.

MICROORGANISMO	MEIO UTILIZADO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	TEMPO DE INCUBAÇÃO DO INÓCULO	TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA RECUPERAÇÃO MICROBIANA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ágar caseína de soja	32.5 ± 2.5°	18 – 24 h	3 – 5 dias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Ágar caseína de soja	32.5 ± 2.5°	18 – 24 h	3 – 5 dias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Ágar caseína de soja	32.5 ± 2.5°	18 – 24 h	3 – 5 dias
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Ágar Sabourand Dextrose	22.5 ± 2.5°	44 – 52 h	3 – 5 dias
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Ágar Sabourand Dextrose	22.5 ± 2.5°	6 – 10 dias	3 – 7 dias
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Ágar caseína de soja	22.5 ± 2.5°	18 – 24 h	3 – 7 dias

Fonte: USP 25 (2002), com exceção do *B.*²⁵ *subtilis*.

3.8.2 Procedimento

Seis frascos por amostra, contendo 50g de cada uma das amostras (A, B, C e D) foram preparados. Os inóculos dos microrganismos, listados na tabela 9, foram distribuídos, em separado, nos frascos contendo a amostra fracionada, conforme representado na figura 6. Para as bactérias, foram inoculadas cerca de 10⁶ UFC/ml e para bolores e leveduras 10⁵ UFC/ml.

A figura 7 ilustra a cabine de segurança biológica (fluxo laminar vertical), contendo material para a execução do teste de eficácia antimicrobiana.

Os frascos contendo a amostra e o inóculo, devidamente fechados, foram homogeneizados manualmente. Imediatamente após a homogeneização, foram preparadas diluições decimais, utilizando caldo Letheen e preparadas duas placas

²⁵ A sigla *B.* significa *Bacillus*.

de Petri (por microrganismo) e adicionado ágar caseína de soja (bactérias) e ágar Sabourand Dextrose (bolores e leveduras). A seguir, as placas foram incubadas a 35°C por 48h (bactérias) e a 25 °C durante 5 a 7 dias (bolores e leveduras), a fim de confirmar a contagem inicial do inóculo. A figura 8 representa o procedimento esquemático das diluições e do preparo das placas.

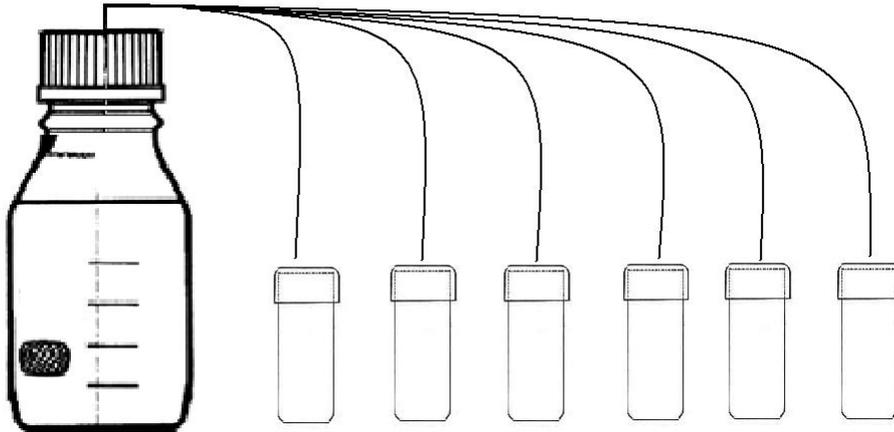


Figura 6 – Esquema de fracionamento das amostras de Água Boricada produzidas em laboratório.



Figura 7 – Fotografia do fluxo laminar contendo material para a execução do teste de eficácia antimicrobiana.

Os frascos, contendo a amostra e o inóculo, foram mantidos a $24 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, em incubadora BOD.

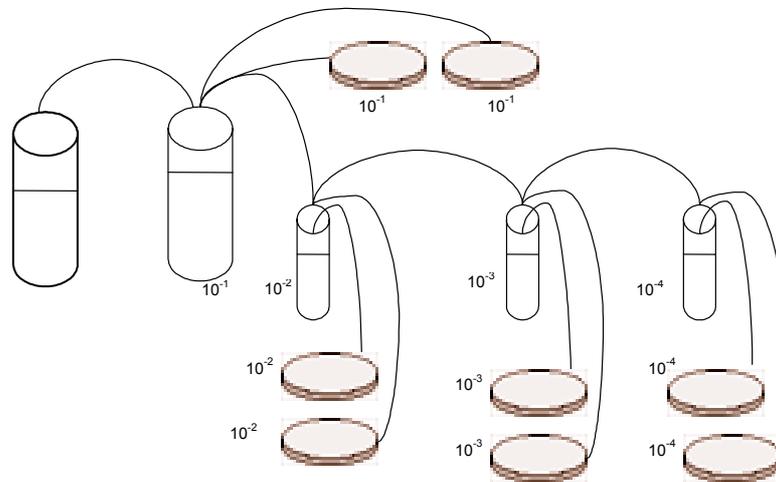


Figura 8 – Esquema da diluição das amostras e distribuição nas placas, para o teste de eficácia antimicrobiana.

Para verificar se houve aumento ou redução da contagem inicial, após 7, 14 e 28 dias, foram realizadas contagens dos microrganismos, através de amostragens de cada frasco, transferindo 1ml para tubos de ensaio e preparadas diluições decimais de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , utilizando Caldo Letheen. De cada diluição, foram preparadas duas placas de Petri (por microrganismo), às quais foram adicionados meio ágar caseína de soja (bactérias) e meio ágar Sabourand Dextrose (bolores e leveduras) e incubadas a $35 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 48h (bactérias) e a $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ durante 5 a 7 dias (bolores e leveduras).

3.8.3 Expressão dos Resultados da Análise

Transcorrido o tempo de incubação, realizou-se a contagem das colônias em cada placa, expressando o resultado como a média das contagens das duas placas da mesma diluição como UFC/ml.

Usando a concentração inicial do inóculo, foi calculada a variação em valores de \log_{10} da concentração de UFC/ml para cada microrganismo nos intervalos de 7, 14 e 28 dias, expressando a variação em termos de redução de log.

3.8.4 Critério para a Eficácia Antimicrobiana

Os requisitos para eficácia antimicrobiana são satisfatórios se as amostras cumprirem com o critério especificado na tabela 10.

Os produtos oftálmicos são enquadrados na categoria 1, enquanto os de uso tópico (em base aquosa) pertencem à categoria 2.

Como o *Bacillus subtilis* não faz parte dos microrganismos preconizados para a execução deste teste, os resultados para este microrganismo não foram considerados nos critérios citados na tabela 10, para a avaliação final das amostras. Os resultados serviram apenas para verificar a eficácia antimicrobiana das amostras de Água Boricada frente à cepa deste microrganismo.

Tabela 10 – Critérios para a eficácia antimicrobiana.

CATEGORIA	MICROORGANISMOS	CRITÉRIOS
1	Bactérias	Não menos que 1.0 log ²⁶ de redução da contagem inicial calculada em 7 dias; não menos que 3.0 log de redução da contagem inicial em 14 dias e não aumentar a quantidade de 14 a 28 dias.
	Bolores e leveduras	Não aumentar a contagem inicial calculada em 7, 14 e 28 dias.
2	Bactérias	Não menos que 2.0 log de redução da contagem inicial em 14 dias e não aumentar a quantidade de 14 a 28 dias.
	Bolores e leveduras	Não aumentar a contagem inicial calculada em 14 e 28 dias.

Fonte: USP 25 (2002).

²⁶ Redução de 1 log é igual a redução de 90,0% da população; 2 log é igual a 99,0% e 3 log é igual a 99,9% de redução da população.

4 RESULTADOS

Neste capítulo, descrevem-se os resultados dos protocolos de investigação (aplicados à população e às farmácias e drogarias), dos ensaios analíticos das amostras (embalagem, rotulagem, microbiológicos e físico-químicos) e do teste de eficácia antimicrobiana da Água Boricada.

4.1 PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO

Primeiramente, apresentam-se os resultados dos protocolos de investigação aplicados à população, seguido dos resultados nas farmácias e drogarias.

4.1.1 Protocolo de Investigação Aplicado à População

Com a utilização do protocolo de investigação constante na tabela 1, foram entrevistadas 115 pessoas, sendo 48,70% do sexo masculino e 51,30% do sexo feminino (figura 9).

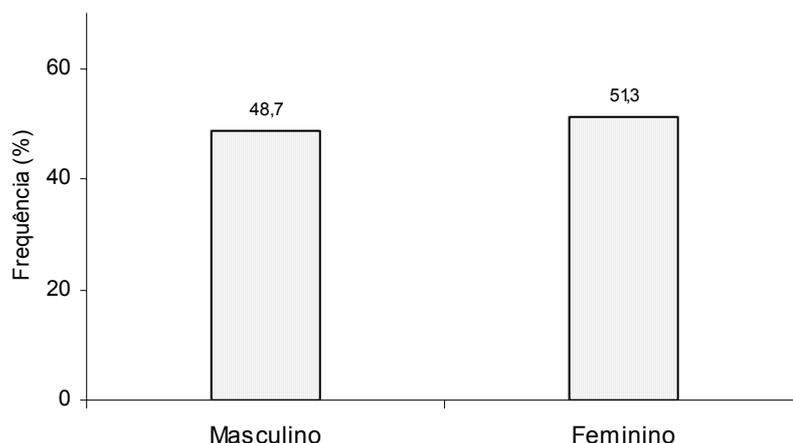


Figura 9 – Distribuição proporcional do sexo da população entrevistada (n=115).

Dos entrevistados, 78,26% eram naturais do Paraná, sendo o restante pertencente aos Estados de Santa Catarina (9,57%), São Paulo (8,69%), Rio

Grande do Sul (1,74%), Pernambuco (0,87%) e Rio de Janeiro (0,87%), conforme exposto na figura 10.

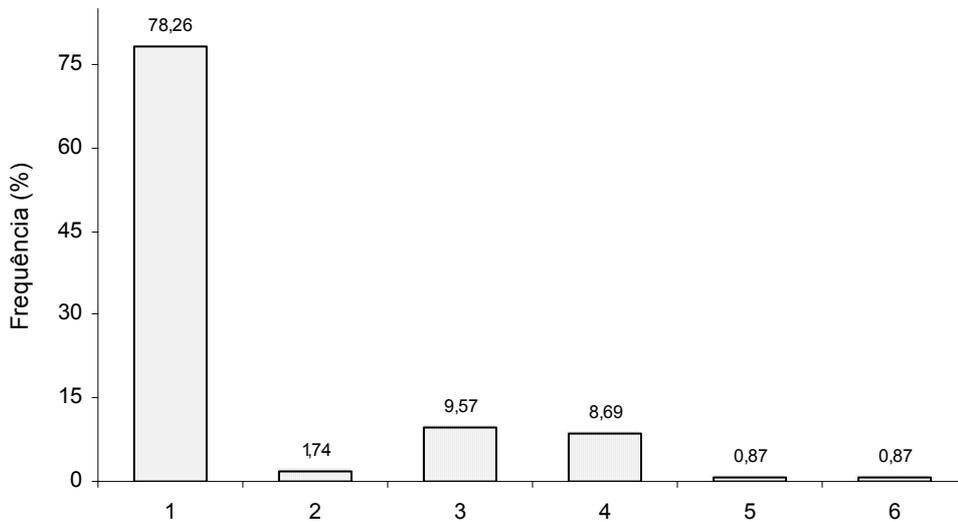


Figura 10 – Distribuição proporcional da naturalidade dos entrevistados (n=115): (1) Paraná, (2) Rio Grande do Sul, (3) Santa Catarina, (4) São Paulo, (5) Pernambuco, (6) Rio de Janeiro.

Cinco faixas etárias foram apresentadas aos entrevistados para assinalar a faixa correspondente. O maior índice foi obtido para a faixa entre 21 e 30 anos (29,57%) e o menor para a faixa de até 20 anos (13,04%). Observou-se uma homogeneidade na distribuição para as outras três faixas etárias. Os resultados estão dispostos na figura 11.

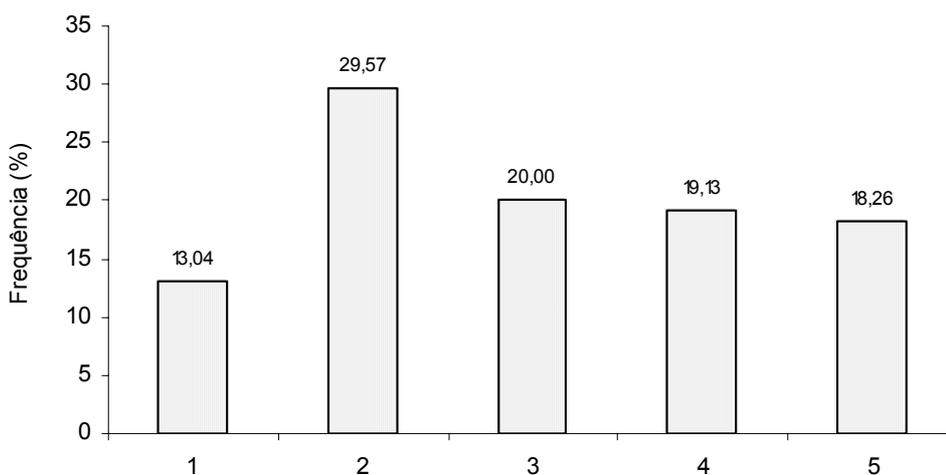


Figura 11 – Faixa etária da população entrevistada (n=115): (1) Até 20 anos, (2) Entre 21 e 30 anos, (3) Entre 31 e 40 anos, (4) Entre 41 e 50 anos, (5) Acima de 50 anos.

Sete níveis de escolaridade foram apresentados à população. A maioria dos entrevistados estava cursando ou havia completado o nível superior (50,44%). O menor índice observado foi para pós-graduação (1,74%). A distribuição do grau de escolaridade dos entrevistados está representada na figura 12.

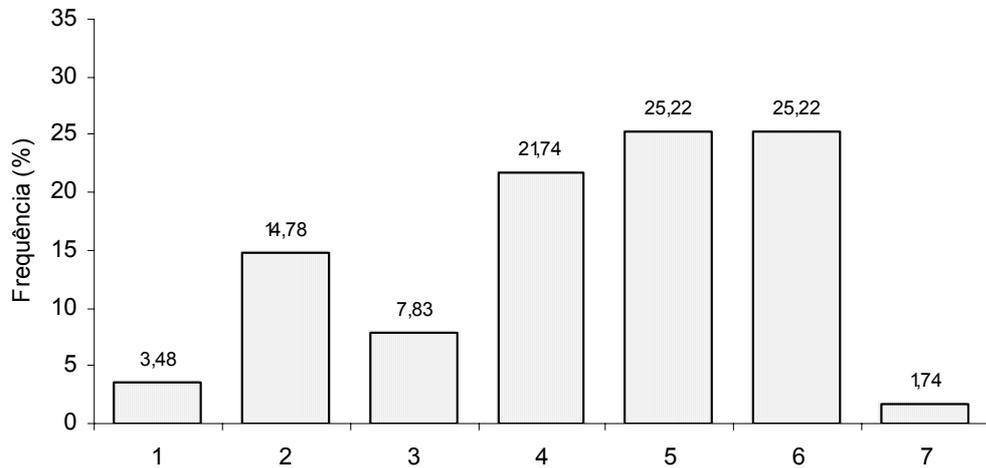


Figura 12 – Grau de escolaridade dos entrevistados (n=115): (1) 1º grau incompleto, (2) 1º grau completo, (3) 2º grau incompleto, (4) 2º grau completo, (5) nível superior incompleto, (6) nível superior completo, (7) pós-graduação.

Na pesquisa realizada, 83,48% dos entrevistados conheciam a Água Boricada, sendo que 77,39% tinham conhecimento da finalidade de uso da mesma e 57,39 % já utilizaram o produto. Os resultados estão apresentados na figura 13.

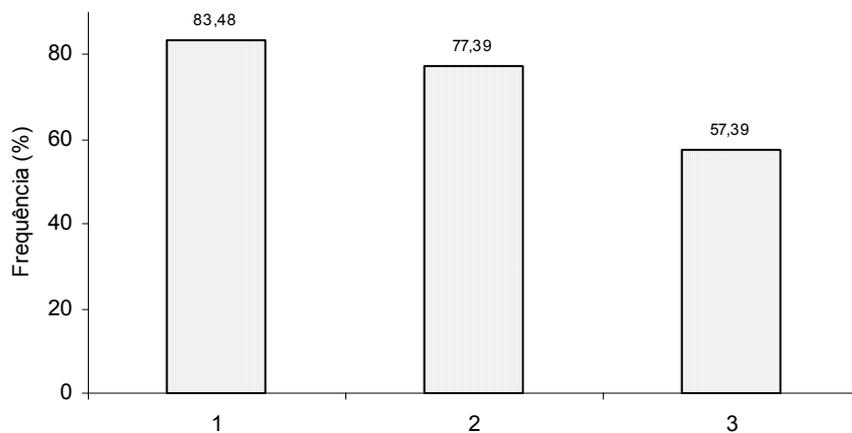


Figura 13 – Frequência das respostas de conhecimento e uso da Água Boricada (n=115): (1) conhecem a Água Boricada; (2) conhecem a finalidade de uso do produto, (3) já utilizaram o produto.

Ao perguntar sobre o conhecimento do uso Água Boricada, foram obtidas 19 respostas, sendo que 71,90% da população entrevistada apontaram espontaneamente a Água Boricada para uso oftalmológico. A distribuição proporcional está disposta na figura 14.

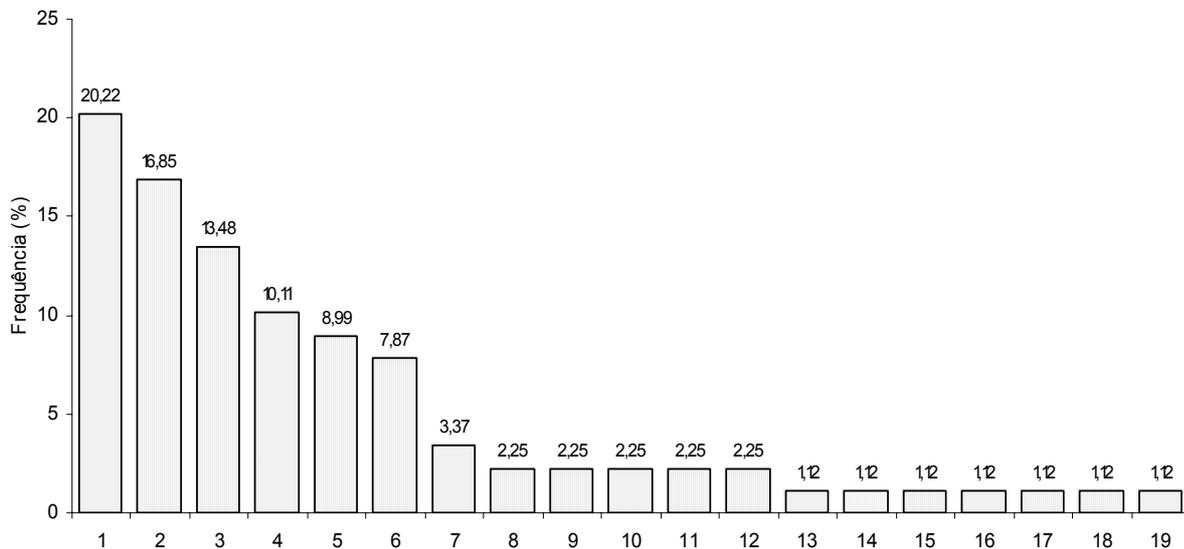


Figura 14 – Distribuição proporcional do conhecimento do uso da Água Boricada (n=89): (1) Conjuntivite, (2) Limpeza dos olhos, (3) Antisséptico, (4) Limpeza das lentes de contato, (5) Limpeza de ferimentos, (6) Limpeza dos olhos e limpeza de ferimentos, (7) Antisséptico e limpeza de ferimentos, (8) Limpeza dos olhos e limpeza das lentes de contato, (9) Limpeza de seios e conjuntivite, (10) Limpeza dos olhos e limpeza dos seios, (11) Limpeza de lentes de contato e conjuntivite, (12) Limpeza dos olhos e pós-cirúrgico, (13) Alergia, (14) Antisséptico e limpeza dos olhos, (15) Limpeza das lentes de contato e limpeza de ferimentos, (16) Limpeza dos seios, limpeza de ferimentos e pós-cirúrgico, (17) Limpeza de ferimentos e conjuntivite, (18) Antisséptico, limpeza dos olhos e limpeza de ferimentos, (19) Antisséptico, limpeza dos olhos e limpeza de lentes de contato.

Para aqueles que responderam que já utilizaram a Água Boricada (n = 66), foi perguntado para qual finalidade o produto foi empregado e foram obtidas 13 respostas, com as seguintes frequências: 77,3% das respostas envolveram aplicações oftalmológicas, sendo que 68,2% referiam-se exclusivamente a uso ocular. A distribuição proporcional está representada na figura 15.

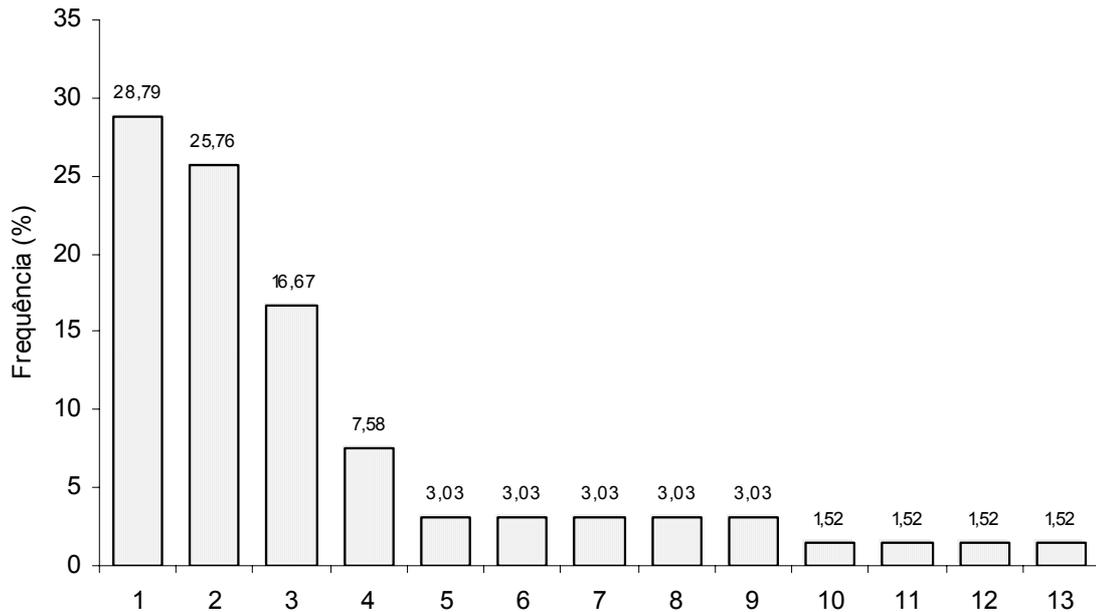


Figura 15 – Distribuição proporcional da utilização da Água Boricada (n=66): (1) conjuntivite, (2) limpeza dos olhos, (3) limpeza de ferimentos, (4) limpeza das lentes de contato, (5) alergia ocular, (6) limpeza dos seios, (7) limpeza dos olhos e dos seios, (8) cicatrização de ferimentos, (9) limpeza dos olhos e de ferimentos, (10) pós-cirurgia ocular, (11) limpeza dos olhos, de ferimentos e pós-cirúrgico, (12) limpeza dos olhos e outro, (13) limpeza das lentes de contato e conjuntivite.

Quanto à forma de utilização, 77,27% responderam lavagem, 15,15% compressas, 7,58% de ambas as formas, conforme ilustrado na figura 16.

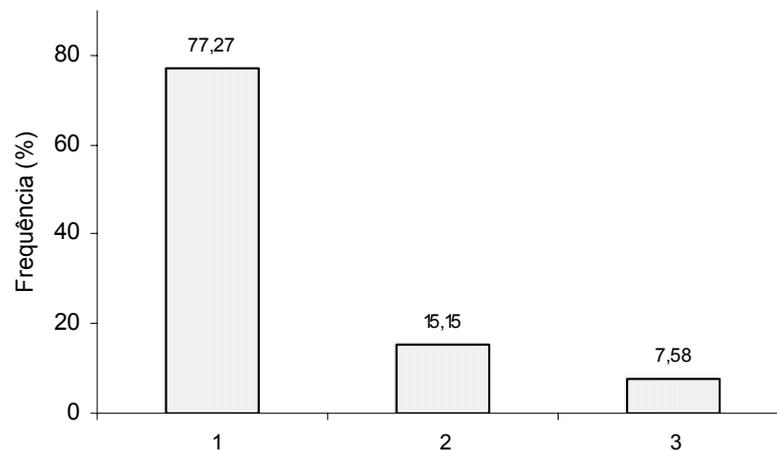


Figura 16 – Distribuição proporcional da forma de utilização da Água Boricada (n=66): (1) Lavagem, (2) Compressa, (3) Ambas as formas.

A frequência do local de aplicação do produto teve o maior índice para os olhos (59,09%). Considerando as demais respostas que envolviam uso

oftalmológico, este índice sobe para 77,26%. A distribuição proporcional está representada na figura 17.

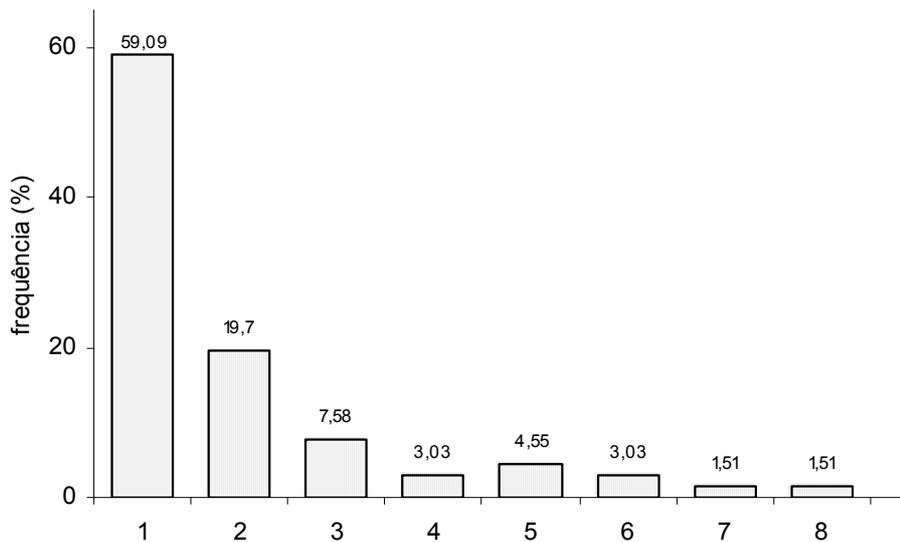


Figura 17 – Distribuição proporcional do local de aplicação da Água Boricada (n=66): (1) olhos, (2) ferimentos, (3) lentes de contato, (4) seios, (5) olhos e ferimentos, (6) olhos e seios, (7) olhos e piercing, (8) olhos e lentes de contato.

Através do cruzamento das respostas, verificou-se que 30,43% dos entrevistados utilizaram o produto diretamente nos olhos, aplicando-o na forma de lavagem.

Os entrevistados adquiriram o produto nos estabelecimentos comerciais principalmente através de receituário médico (42,42%). A frequência está mostrada na figura 18.

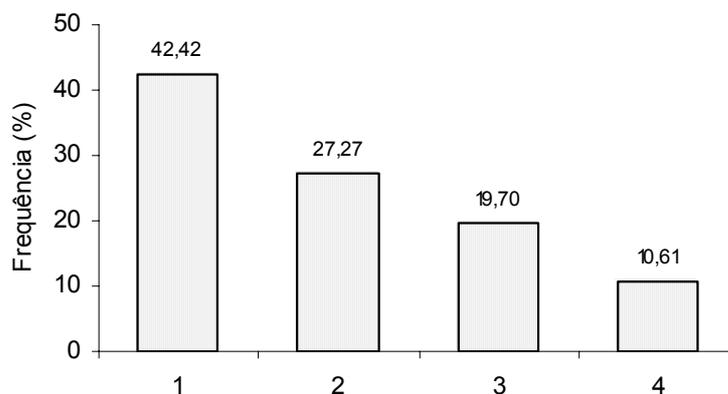


Figura 18 – Frequência da forma de aquisição da Água Boricada (n=66): (1) receituário médico, (2) indicação de parentes, (3) indicação da farmácia, (4) outras formas (indicação de amigos e literatura).

Quanto ao resultado esperado, 80,30% dos entrevistados acreditaram que foi obtido o resultado esperado com o uso do produto, enquanto que 12,12% alegaram que não tinham alcançado e 7,58% não souberam responder. A figura 19 ilustra a frequência encontrada.

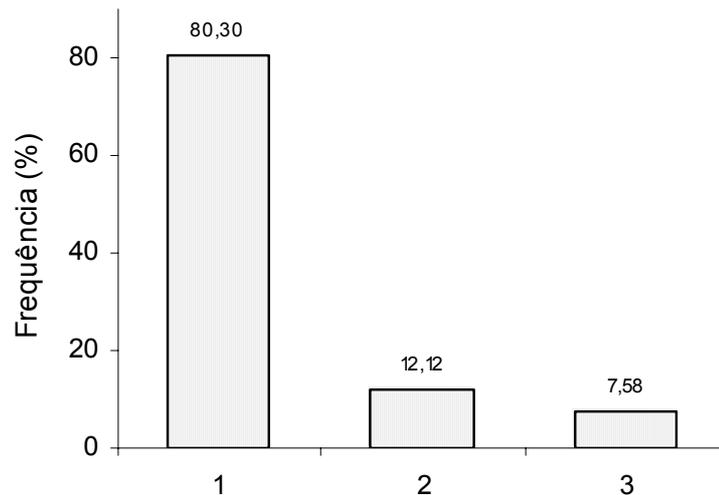
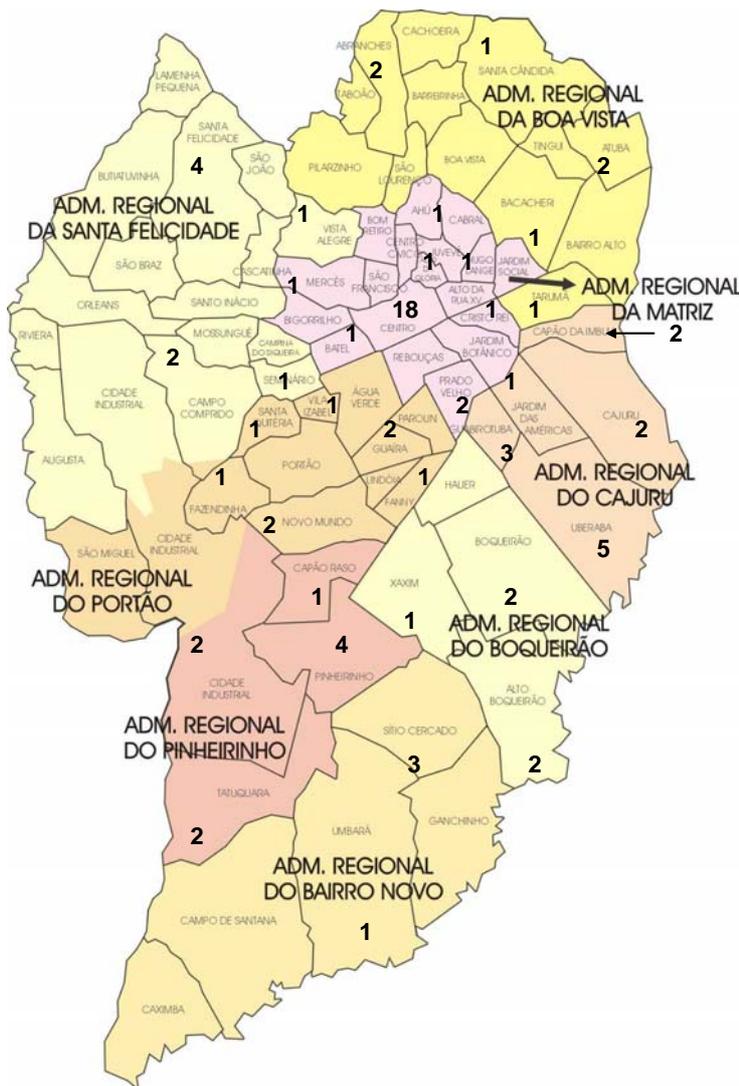


Figura 19 – Frequência da obtenção do resultado esperado com o uso da Água Boricada (n=66): (1) obtiveram o resultado esperado, (2) não alcançaram o resultado esperado, (3) não souberam responder.

4.1.2 Protocolo de Investigação Aplicado nas Farmácias e Drogarias

Com a utilização do protocolo de investigação mostrado na tabela 2, a pesquisa foi realizada em 84 farmácias e drogarias de Curitiba, distribuídas no centro e nos bairros, conforme ilustrado na figura 20.

Quanto aos estabelecimentos, 57,14% foram caracterizados como individualizado, 13,10% como permissionário e 29,76% como unidade de rede. A frequência está mostrada na figura 21.



Divisão de Bairros e Administrações Regionais de Curitiba.
Fonte: IPPUC (2004).

REGIÃO	BAIRRO	QTE ²⁷
Bairro Novo (4)	Sítio Cercado	3
	Vila Nori	1
Boa Vista (7)	Atuba	2
	Bacacheri	1
	Higienópolis	1
	Tarumã	1
	Abranches	2
Boqueirão (5)	Alto Boqueirão	2
	Boqueirão	2
	Xaxim	1
Cajuru (13)	Cajuru	2
	Capão da Imbuia	2
	Jdim das Américas	1
	Guabirotuba	3
	Uberaba	5
Matriz (26)	Alto da Glória	1
	Bigorrihlo	1
	Centro	18
	Juvevê	1
	Prado Velho	2
	Mercês	1
	Cristo Rei	1
	Batel	1
Pinheirinho (9)	CIC	2
	Pinheirinho	4
	Tatuquara	2
Portão (12)	Capão Raso	1
	Santa Quitéria	1
	Vila Guaira	2
	Água Verde	4
	Novo Mundo	2
	Fazendinha	1
	Vila Izabel	1
Vila Fanny	1	
Santa Felicidade (8)	Campo Comprido	2
	Santa Felicidade	4
	Seminário	1
	Vista Alegre	1
TOTAL		84

Figura 20 – Distribuição dos estabelecimentos pesquisados na Cidade de Curitiba.

²⁷ A sigla QTE significa quantidade.

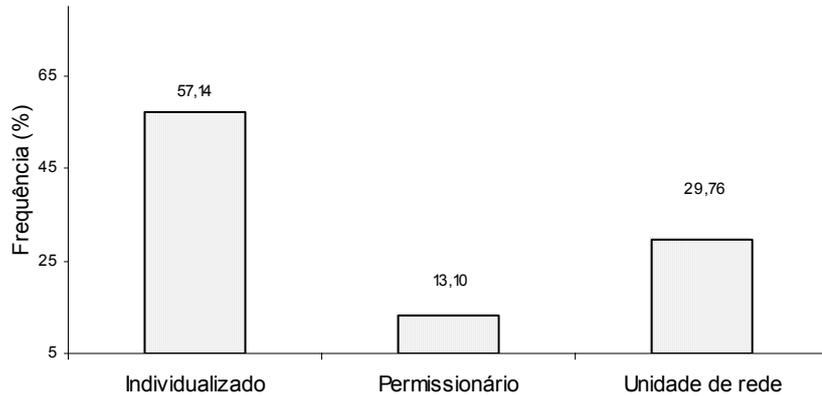


Figura 21 – Frequência da caracterização das farmácias e drogarias entrevistadas (n=84).

Apenas um estabelecimento não vendia a Água Boricada, sendo que o entrevistado complementou com a informação que o estabelecimento era novo.

Os questionários foram respondidos pelos atendentes no balcão (58,33%), pelos farmacêuticos (25,00%), pelos proprietários (15,48%) e por farmacêutico que também era proprietário (1,19%). A distribuição proporcional está ilustrada na figura 22.

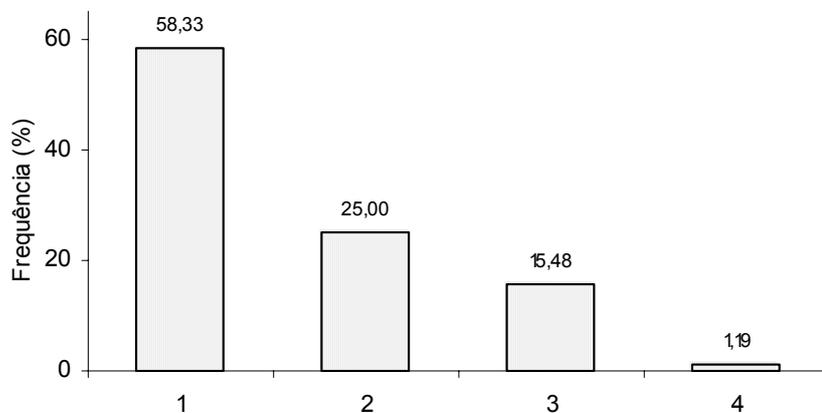


Figura 22 – Frequência da função no estabelecimento de quem respondeu ao questionário (n=84): (1) atendentes, (2) farmacêuticos, (3) proprietário, (4) farmacêutico / proprietário.

Entre os estabelecimentos que vendem Água Boricada, 30,12% responderam que adquirem sempre da mesma marca, enquanto o restante (69,88%) não o fazem, conforme mostra a figura 23.

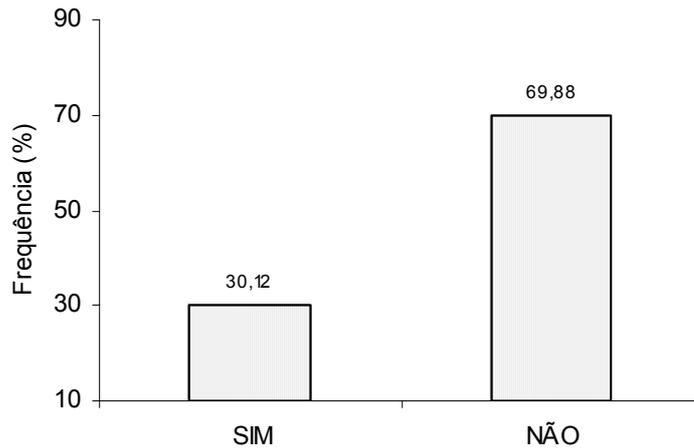


Figura 23 – Frequência dos estabelecimentos que vendem Água Boricada da mesma marca (n=83).

Os motivos apontados pelas unidades para venderem a Água Boricada sempre da mesma marca foram: 76% devido à confiabilidade e qualidade da marca, 12% responderam que é definido pelo departamento de compras do estabelecimento, 8% devido ao preço do produto, 4% associaram preço, confiabilidade e qualidade. A distribuição proporcional está representada na figura 24.

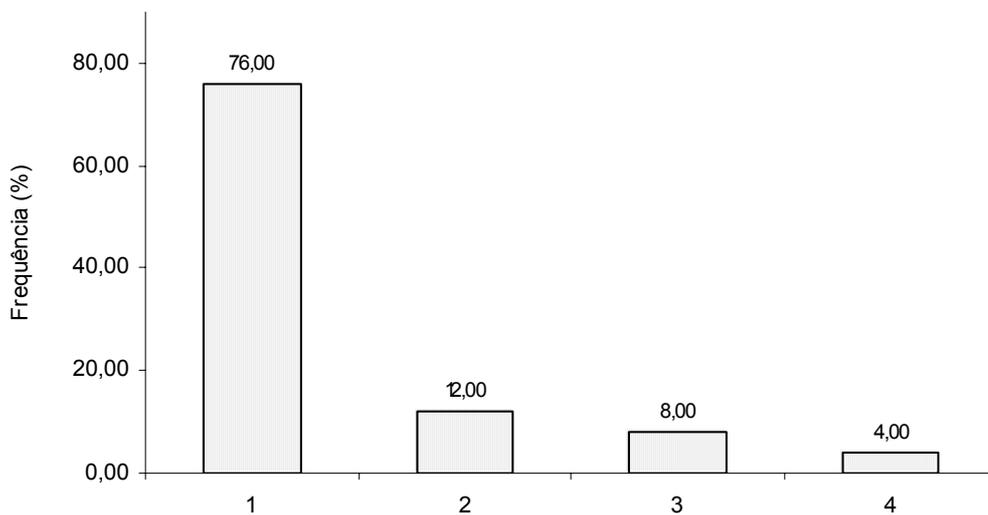


Figura 24 – Frequência dos motivos das farmácias e drogarias para comprar Água Boricada sempre da mesma marca (n=25): (1) confiabilidade e qualidade na marca, (2) definido pelo departamento de compras, (3) preço do produto, (4) preço, confiabilidade e qualidade na marca.

Os estabelecimentos que não compram sempre da mesma marca, responderam que 77,59% depende do preço ofertado para o produto, 17,24% da

disponibilidade no mercado e 5,17% como opção para o cliente. A distribuição proporcional está ilustrada na figura 25.

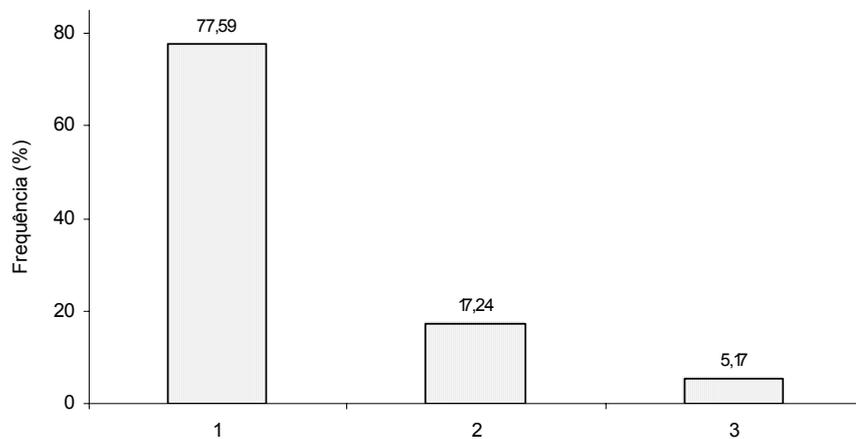


Figura 25 – Frequência dos motivos expostos pelos estabelecimentos para não efetuar a compra de Água Boricada sempre da mesma marca (n=58): (1) preço, (2) disponibilidade de mercado, (3) opção para o cliente.

A venda mensal variou de um estabelecimento para outro, de 3 à 180 unidades, com média de 33,02 frascos ao mês, com desvio padrão igual a 33,28. Sessenta e cinco estabelecimentos vendem até 40 frascos/mês, 12 estabelecimentos vendem de 41 a 80 unidades e 6 responderam que vendem acima de 81 unidades mensais. Os estabelecimentos responderam que a maior porcentagem de venda da Água Boricada ocorre por: solicitação do cliente (43,37%), seguida pelo receituário médico (36,14%) e indicação no balcão (13,25%), os três motivos anteriores estão envolvidos (6,02%) e 1,31% responderam que as maiores porcentagens de venda ocorrem a pedido do cliente e receituário médico, respectivamente. Os resultados estão representados na figura 26.

A frequência do fator que influencia na venda do produto ficou assim distribuída: 49,40% devido à ação terapêutica, 36,14% não há influência, 12,05% o preço baixo, 2,41% pela ação terapêutica e baixo preço. A distribuição proporcional encontra-se ilustrada na figura 27.

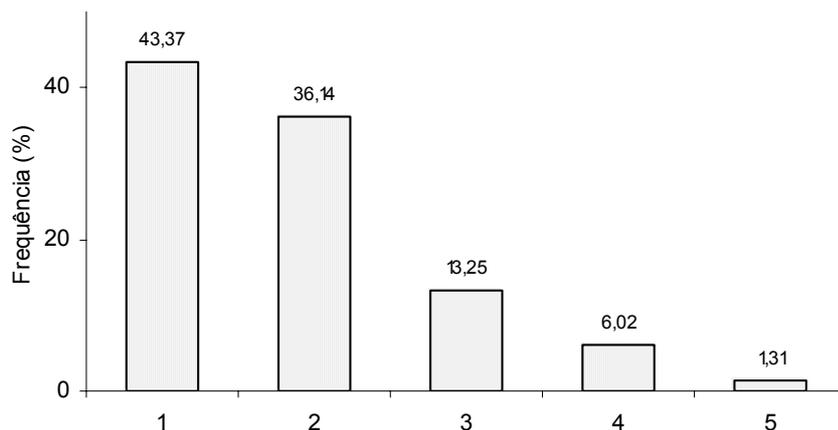


Figura 26 – Frequência do motivo das vendas do produto nos estabelecimentos entrevistados (n=83): (1) pedido pelo cliente, (2) receituário médico, (3) indicação no balcão, (4) as três opções anteriores, (5) pedido pelo cliente e indicação no balcão.

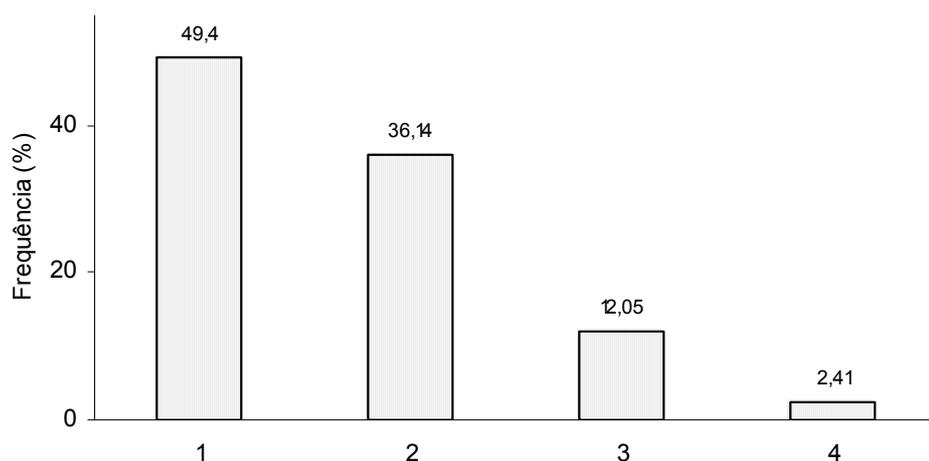


Figura 27 – Distribuição proporcional dos fatores que influenciam na venda da Água Boricada (n=83): (1) ação terapêutica, (2) não há influência, (3) baixo preço, (4) ação terapêutica e baixo preço.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NAS AMOSTRAS

A seguir, estão descritos os resultados dos ensaios analíticos referentes à avaliação da embalagem, rotulagem, dos ensaios microbiológicos e físico-químicos, realizados nas amostras listadas na tabela 3.

4.2.1 Avaliação da Embalagem

Todos os fabricantes utilizaram frascos plásticos para acondicionar o produto. As amostras apresentaram variação na coloração dos frascos (incolor, branca, amarela e azul) e na transparência (semitransparente e opaco). Na tabela 11, ilustram-se os tipos de frascos utilizados pelos fabricantes e a frequência.

Tabela 11 – Tipos de frascos das amostras de Água Boricada.

TIPO DE FRASCO	COLORAÇÃO	FABRICANTES
Semitransparente	Incolor (56%)	F1, F2, F7, F8, F9, F11, F15, F16, F17, F18, F19, F20, F22, F25
	Amarela (4%)	F4
Opaco	Azul (8%)	F3, F23
	Branca (32%)	F5, F6, F10, F12, F13, F14, F21, F24

Os fabricantes F1, F3, F4, F8, F9, F11, F14, F15, F20, F23, F24 e F25 utilizaram bico conta-gotas e tampa rosca para fechamento dos frascos. O fabricante F5 utilizou uma tampa rosca com bico conta-gotas e uma pequena tampa de sobrepor no bico do frasco. Os demais fabricantes (F2, F6, F7, F10, F12, F13, F16, F17, F18, F19, F21 e F22) utilizaram apenas tampa rosca.

Todos os frascos continham lacre. Entretanto, o tipo utilizado pelos fabricantes F12, F24 e F25 permitiu a abertura dos frascos sem rompimento dos lacres.

O volume nominal das amostras variou de um fabricante para outro, apresentando volumes de 95 ml (4%), 100ml (76%), 120 ml (4%), 200 ml (12%) e 1000ml (4%), conforme apresentado na tabela 12.

Tabela 12 – Volume nominal declarado das amostras.

VOLUME NOMINAL (ml)	FABRICANTES	AMOSTRAS
95	F19	5, 36
100	F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F9, F10, F12, F13, F14, F15, F18, F20, F21, F22, F23, F24	4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47
120	F16	3
200	F8, F 11, F25	2, 11, 26, 29
1.000	F17	1

4.2.2 Avaliação da Rotulagem

Na sequência, apresentam-se os resultados obtidos na avaliação da rotulagem quanto à formulação, prazo de validade, indicação de uso do produto para aplicação oftalmológica e outras informações relevantes para o consumidor.

4.2.2.1 Formulação

Dezoitos fabricantes, 72% (38 amostras), indicavam no rótulo a concentração de ácido bórico igual a 3% e os outros sete fabricantes, 28% (9 amostras), igual a 2%.

Dez fabricantes, 40% (28 amostras), não especificaram no rótulo do produto qual o tipo de água utilizada no preparo da Água Boricada. Nove fabricantes, 36% (12 amostras), indicaram a utilização de água deionizada. Apenas quatro fabricantes, 16% (4 amostras), especificaram a utilização da água destilada, que é a recomendada para o processo de fabricação da Água Boricada (Silva, 1926; Lucas, 1959; Prista e Alves, 1973). Dois fabricantes, 8%, (3 amostras) indicaram que seguem a formulação constante na Farmacopéia Brasileira (Silva, 1926), supondo que a água utilizada seja a destilada.

Dezoito fabricantes, 72% (36 amostras), não declararam que é utilizado conservante na formulação de seus produtos. Os outros sete fabricantes (28%) indicaram que utilizaram, sendo que seis deles, 24% (10 amostras), utilizaram metilparabeno e um fabricante, 4% (uma amostra), utilizou timerosal.

Na tabela 13 estão apresentadas as formulações das amostras, segundo informações dos rótulos dos produtos, quanto à concentração nominal de ácido bórico, tipo de água utilizada na fabricação, o conservante e a sua concentração.

Tabela 13 – Formulação das amostras de Água Boricada.

FABRICANTE	FORMULAÇÃO		
	Conc. ácido bórico (g%)	Tipo de água utilizada	Conservante
1	3	Não específica	Metilparabeno 0,08g%
2	3	Não específica	Não declarado
3	3	Não específica	Não declarado
4	3	Deionizada	Não declarado
5	3	Não específica	Não declarado
6	2	Deionizada	Timerosal 0,001g%
7	2	Destilada	Não declarado
8	3	Não específica	Não declarado
9	3	Deionizada	Metilparabeno (*)
10	3	Destilada	Não declarado
11	3	Deionizada	Metilparabeno 0,1g%
12	3	Não específica	Não declarado
13	2	Não específica	Não declarado
14	3	Não específica	Não declarado
15	3	Deionizada	Metilparabeno 0,03g%
16	2	(**)	Não declarado
17	3	Deionizada	Não declarado
18	2	Não específica	Não declarado
19	2	Não específica	Não declarado
20	3	Deionizada	Metilparabeno 0,1g%
21	2	Destilada	Metilparabeno (*)
22	3	(**)	Não declarado
23	3	Destilada	Não declarado
24	3	Deionizada	Não declarado
25	3	Deionizada	Não declarado

(*) Concentração não declarada.

(**) Informa que a formulação utilizada é a constante na Farmacopéia Brasileira.

4.2.2.2 Prazo de validade

Diferentes prazos de validade foram observados entre os fabricantes, com mínimo de 12 meses e máximo de 48 meses, conforme ilustrado na tabela 14.

Tabela 14 – Prazos de validade das amostras de Água Boricada.

PRAZO DE VALIDADE (meses)	FABRICANTES	AMOSTRAS
12	F16 e F25	02, 03
24	F1, F2, F5, F7, F8, F9, F10, F13, F15, F17, F18, F19, F20, F21, F22 e F23	01, 04, 05, 07, 08, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 46
30	F4	37
36	F6, F11, F12, F14 e F24	06, 26, 29, 39, 40, 42, 47
48	F3	09, 14, 20, 22, 38, 41, 43, 44, 45

A maioria dos fabricantes (64%) apresentou prazo de validade de 24 meses, sendo o menor índice (4%) para amostras com 30 e 48 meses de validade. A distribuição proporcional dos fabricantes está disposta na figura 28.

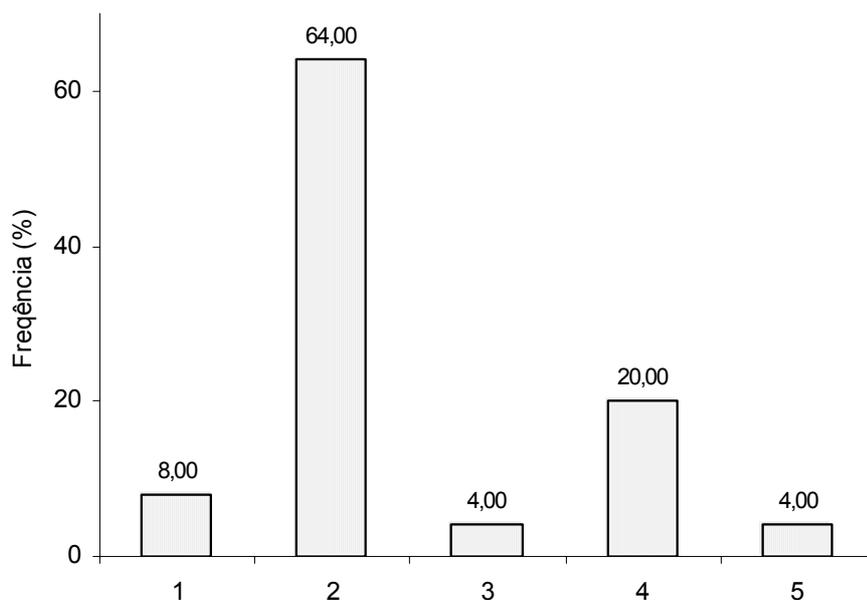


Figura 28 – Prazo de validade das amostras de Água Boricada (n=25): (1) 12 meses, (2) 24 meses, (3) 30 meses, (4) 36 meses, (5) 48 meses.

4.2.2.3 Indicação de uso e outras informações

Quatorze fabricantes, 56% (F1, F4, F6, F7, F8, F12, F13, F14, F15, F19, F21, F23, F24 e F25), representados por 20 amostras, indicaram o produto para uso oftalmológico. O fabricante F12 indicou ao usuário que o produto pode ser aplicado por instilação. O fabricante F1, apesar de indicar o produto para uso oftálmico, acrescentou a inscrição “não estéril”. O fabricante F15 esclareceu que o produto só deve ser utilizado se o mesmo estiver “límpido, incolor, inodoro e sem partículas em suspensão ou em depósito”.

As indicações para uso oftalmológico foram: “antisséptico ocular” (10 fabricantes, 40%), tratamento da conjuntivite (4 fabricantes, 16%), nas “oftalmias” (3 fabricantes, 12%), “irritações nos olhos” (1 fabricante, 4%), “descongestionante oftálmico, nas irritações e antibacteriano e antifúngico na limpeza ocular” (1 fabricante, 4%). Somente um fabricante orientou para procurar orientação médica, caso persistam os sintomas.

Três fabricantes, 12% (F2, F5 e F10), representados por 7 amostras, não fizeram menção quanto à indicação de uso do produto, sendo que um deles (F10) não informou nem mesmo que o produto é de uso externo.

Os demais fabricantes indicaram o produto apenas como “antisséptico”, sem indicação do local de aplicação (F3, F17, F22) ou para aplicação em ferimentos, seios e duchas vaginais (F9, F11, F16, F18 e F20). O fabricante F18 acrescentou que o produto pode ser utilizado em “inflamações em geral”, sem indicar o local de aplicação.

O fabricante F11 informou ao usuário que a compressa utilizada não deve tocar o bocal do frasco, para não contaminar a solução e que o produto não deve ser utilizado se apresentar turvação.

Com exceção dos fabricantes F10 e F25, que não prestam qualquer informação ao usuário, todos os demais trazem algum tipo de informação, como o modo de usar, cuidados de conservação, precauções especiais, variando o nível de detalhamento entre os fabricantes.

Classificando o nível de informações do rótulo, foi considerado como “bom” o rótulo de apenas três fabricantes, 12% (F9, F11 e F15), “regular” de dez fabricantes,

40%, (F3, F5, F6, F12, F13, F14, F18, F19, F20, F24) e “ruim” de doze fabricantes , 48%, (F1, F2, F4, F7, F8, F10, F16, F17, F21, F22, F23, F25).

Entre os fabricantes que não indicaram o uso oftalmológico, nenhum deles faz qualquer restrição quanto à utilização do produto nos olhos.

4.2.3 Ensaios Microbiológicos

Nos ensaios microbiológicos, as amostras foram submetidas ao ensaio para contagem de viáveis totais (bactérias, bolores e leveduras) e pesquisa de patógenos.

4.2.3.1 Contagem de viáveis totais

Das 47 amostras analisadas, 13 apresentaram contaminação microbiana, representando 27,66% das amostras. Em uma amostra foi detectada a presença de bactérias (amostra 13), enquanto que bolores e leveduras foram detectados em 12 amostras (1, 3, 4, 5, 7, 9, 14, 15, 19, 23, 34 e 38).

A figura 29 ilustra a contaminação por bolores na amostra 34, em diferentes diluições, cuja contagem foi de 10^3 UFC/ml.



Figura 29 – Fotografia da contagem de bolores e leveduras na amostra 34. (Placas da esquerda diluição 10^{-2} e da direita 10^{-1})

Os resultados obtidos para as contagens de bactérias, bolores e leveduras estão dispostos na tabela 15.

Tabela 15 – Resultados da contagem de viáveis totais nas amostras de Água Boricada.

AMOSTRA	CONTAGEM DE VIÁVEIS TOTAIS	
	Bactérias (UFC/ml)	Bolores e leveduras (UFC/ml)
1	< 10	10
2	< 10	< 10
3	< 10	15
4	< 10	10
5	< 10	10
6	< 10	< 10
7	< 10	10
8	< 10	< 10
9	< 10	10
10	< 10	< 10
11	< 10	< 10
12	< 10	< 10
13	$1,1 \times 10^3$	< 10
14	< 10	10
15	< 10	10
16	< 10	< 10
17	< 10	< 10
18	< 10	< 10
19	< 10	10
20	< 10	< 10
21	< 10	< 10
22	< 10	< 10
23	< 10	10
24	< 10	< 10
25	< 10	< 10
26	< 10	< 10
27	< 10	< 10
28	< 10	< 10
29	< 10	< 10
30	< 10	< 10
31	< 10	< 10
32	< 10	< 10
33	< 10	< 10
34	< 10	10^3
35	< 10	< 10
36	< 10	< 10
37	< 10	< 10
38	< 10	15
39	< 10	< 10
40	< 10	< 10
41	< 10	< 10
42	< 10	< 10
43	< 10	< 10
44	< 10	< 10
45	< 10	< 10
46	< 10	< 10
47	< 10	< 10

4.2.3.2 Pesquisa de patógenos

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença dos patógenos pesquisados, sendo o resultado expresso para todas as amostras como “ausência/1g” .

4.2.4 Ensaio Físico-Químicos

As amostras foram avaliadas quanto ao aspecto, pH e teor de ácido bórico.

4.2.4.1 Aspecto

Todas as amostras apresentaram-se incolores. Vinte e nove amostras (61,70%) apresentaram-se límpidas, enquanto em dezoito amostras (38,30%) foi visualizada a presença de partículas estranhas em suspensão, as quais não atenderam os requisitos para as soluções oftálmicas. Os resultados estão expressos na tabela 16.

Tabela 16 – Aspecto das amostras de Água Boricada.

ASPECTO	AMOSTRAS
Límpido	6, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 30, 31, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45 e 47
Presença de material em suspensão	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 25, 26, 29, 32, 34, 35, 36, 42, e 46

4.2.4.2 Determinação do pH

O valor de pH mais baixo encontrado foi de 3,1 e o mais alto de 7,1. O valor médio foi igual a 4,7. A maioria das amostras (total de 36) apresentou valor de pH entre 4,0 e 5,3. Os valores de pH para cada amostra estão dispostos na tabela 17.

4.2.4.3 Teor de ácido bórico

O teor de ácido bórico das amostras ficou entre 64,7% e 119,0% do valor nominal declarado. Quatro amostras (de um único fabricante) apresentaram teor de ácido bórico bem abaixo do declarado (entre 64,7% e 65,7%). Trinta e duas amostras apresentaram resultados dentro da faixa de 91,0 a 105,0%.

Considerando um limite máximo de variação igual a $\pm 10,0\%$ em relação à percentagem do teor declarado de ácido bórico, 19,15% das amostras analisadas apresentaram o teor fora da faixa de 90,0 a 110,0% do declarado.

Os resultados obtidos para a concentração do ácido bórico estão apresentados na tabela 17.

4.3 TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA

Os resultados obtidos no teste de eficácia antimicrobiana das amostras de Água Boricada produzidas em laboratório e contaminadas artificialmente com cepas de microrganismos estão descritas a seguir.

Imediatamente após a inoculação, constatou-se um nível de contaminação inicial na ordem de 10^6 UFC/ml para cepas de bactérias (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*) e de 10^5 UFC/ml para bolores e leveduras (*C. albicans* e *A. niger*).

Os resultados das análises efetuadas após 7, 14 e 28 dias de incubação, mostraram que as quatro amostras afetaram o crescimento das cepas dos microrganismos testados, em diferentes níveis de redução, conforme o tipo do microrganismo e da amostra.

Os menores índices de eficácia antimicrobiana, entre as quatro amostras, pertenceram às amostras C (frente à cepa de *A. niger*) e D (frente às cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*).

Todas as quatro amostras apresentaram efeito bacteriostático frente à cepa de *B. subtilis*; os resultados mostraram um decréscimo inicial nos primeiros 7 dias, mantendo a concentração no restante do período do teste.

Tabela 17 – Valores de pH e concentração de ácido bórico nas amostras de Água Boricada.

AMOSTRA	VALORES DE pH	CONC. DECLARADA (g%)	RESULTADO OBTIDO (g%)	PORCENTAGEM DO DECLARADO (%)
1	4,6	3	(3,15 ± 0,01)	105,0
2	4,7	3	(3,27 ± 0,01)	109,0
3	4,1	2	(2,10 ± 0,03)	105,0
4	4,3	2	(2,20 ± 0,01)	110,0
5	4,5	2	(2,08 ± 0,02)	104,0
6	4,5	2	(2,00 ± 0,01)	100,0
7	3,9	3	(3,18 ± 0,02)	106,0
8	4,0	3	(3,10 ± 0,01)	103,3
9	7,0	3	(2,79 ± 0,03)	93,0
10	4,7	2	(2,04 ± 0,01)	102,0
11	4,8	3	(3,24 ± 0,01)	108,0
12	4,8	3	(2,08 ± 0,01)	104,0
13	4,8	3	(3,08 ± 0,01)	102,7
14	7,0	3	(2,76 ± 0,01)	92,0
15	4,4	2	(2,19 ± 0,01)	109,5
16	4,1	3	(3,10 ± 0,01)	103,3
17	5,1	3	(1,97 ± 0,01)	65,7
18	5,3	3	(1,94 ± 0,02)	64,7
19	3,6	3	(1,95 ± 0,01)	65,0
20	7,0	3	(2,73 ± 0,02)	91,0
21	5,2	3	(2,66 ± 0,03)	88,7
22	7,0	3	(2,80 ± 0,02)	93,3
23	3,7	3	(1,96 ± 0,01)	65,3
24	4,3	2	(2,24 ± 0,02)	112,0
25	4,1	3	(3,00 ± 0,01)	100,0
26	4,0	3	(3,12 ± 0,01)	104,0
27	4,0	3	(3,14 ± 0,02)	104,7
28	4,2	3	(2,91 ± 0,03)	97,0
29	4,1	3	(3,14 ± 0,04)	104,7
30	4,2	3	(2,92 ± 0,02)	97,3
31	4,1	3	(3,01 ± 0,01)	100,3
32	4,7	2	(1,99 ± 0,02)	99,5
33	4,1	3	(3,14 ± 0,02)	104,7
34	4,9	3	(2,91 ± 0,01)	97,0
35	4,1	3	(3,05 ± 0,02)	101,7
36	4,6	2	(1,94 ± 0,02)	97,0
37	4,3	3	(2,40 ± 0,02)	80,0
38	7,0	3	(2,73 ± 0,01)	91,0
39	4,0	3	(3,03 ± 0,01)	101,0
40	4,0	3	(3,25 ± 0,01)	108,3
41	7,1	3	(2,80 ± 0,01)	93,3
42	4,3	3	(2,68 ± 0,02)	89,3
43	7,0	3	(2,80 ± 0,01)	93,3
44	4,3	3	(2,91 ± 0,01)	97,0
45	4,3	3	(2,84 ± 0,01)	94,7
46	3,1	3	(3,57 ± 0,03)	119,0
47	4,1	3	(2,88 ± 0,03)	96,0

As figuras 30, 31 e 32 ilustram o crescimento de cepas dos microrganismos, durante o desenvolvimento do teste.

Na figura 30, observa-se a diferença de crescimento da cepa de *C. albicans*, nas 4 amostras testadas, após 14 dias de incubação das amostras contaminadas artificialmente, sendo que todas as placas possuem a mesma diluição (10^{-2}).

A figura 31 mostra o resultado em 28 dias para a cepa de *A. niger* nas 4 amostras testadas. Devido à diferença de crescimento do microrganismo e o tamanho das colônias, para facilitar a visualização, foram fotografadas as placas referentes à diluição 10^{-4} das amostras C e D, enquanto que para as amostras A e B foram utilizadas as placas da diluição 10^{-1} .

O resultado em 14 dias para as cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* está ilustrado na figura 32. As placas mostram nitidamente a diferença de crescimento dos microrganismos, cuja redução foi menor nas amostras C e D.



Figura 30 – Fotografia do resultado do teste de eficácia antimicrobiana aos 14 dias, para a cepa de *C. albicans* nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório (linha superior: amostras A e B; linha inferior: amostras C e D).

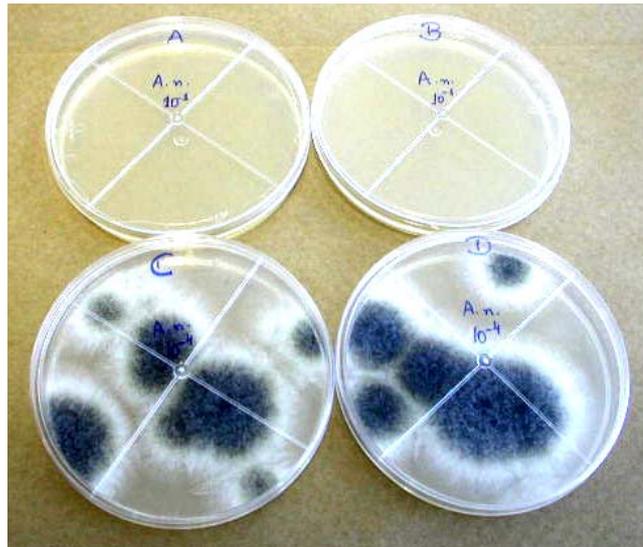


Figura 31 – Fotografia do resultado do teste de eficácia antimicrobiana aos 28 dias para a cepa de *A. niger* nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório (linha superior: amostras A e B, diluição 10^{-1} ; linha inferior: amostras C e D, diluição 10^{-4}).

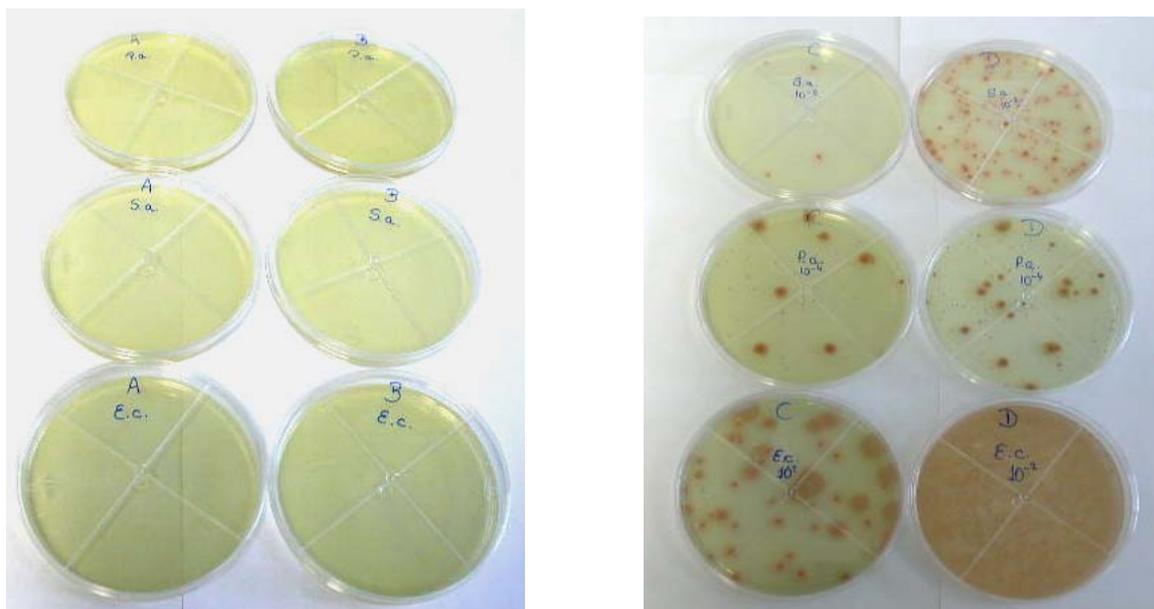


Figura 32 – Fotografia do resultado do teste de eficácia antimicrobiana aos 14 dias, para as cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório (foto da esquerda amostras A e B, diluição 10^{-1} ; foto da direita amostras C e D, diluição 10^{-2} para as placas de *S. aureus* e *E. coli* e diluição 10^{-4} para as placas de *P. aeruginosa*).

A figura 33 representa a redução do crescimento dos microrganismos nas amostras contaminadas artificialmente.

Na tabela 18 estão relacionados os resultados detalhados obtidos no teste de eficácia antimicrobiana e a tabela 19 ilustra a redução do inóculo inicial, em número de log.

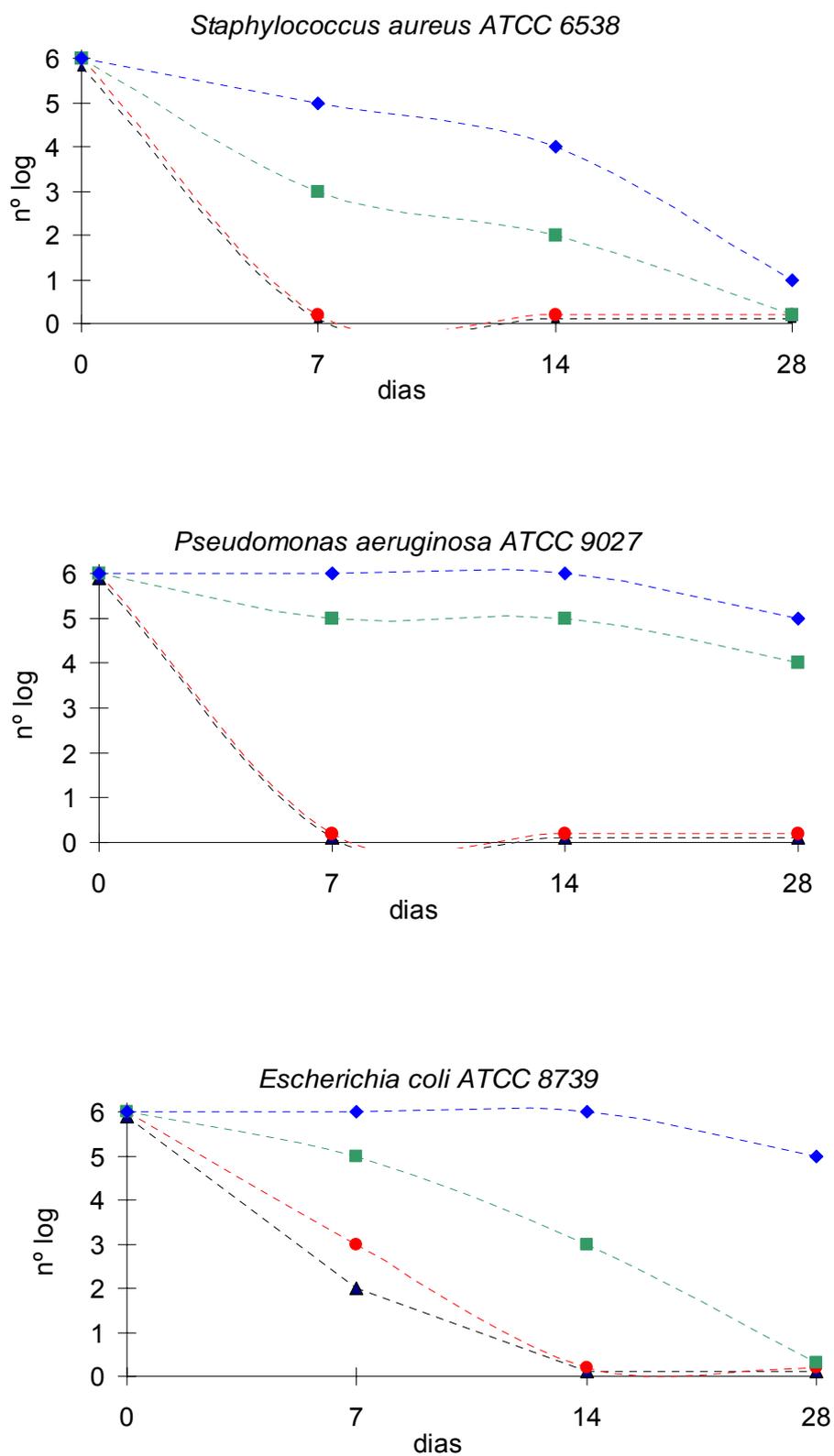


Figura 33 – Redução do crescimento das cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (em número de log) nas amostras de Água Boricada produzidas no laboratório e contaminadas artificialmente.

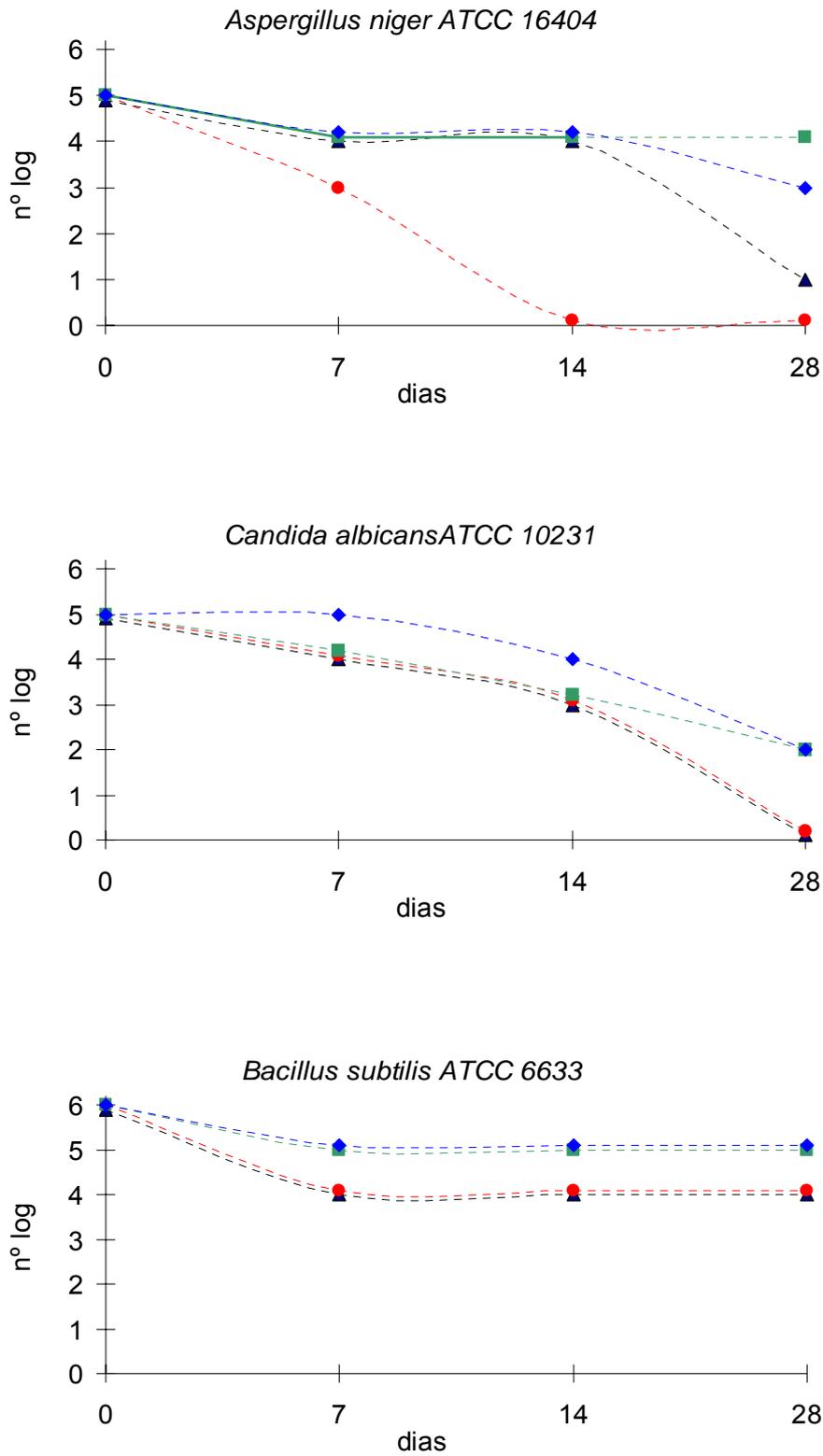


Figura 34 – Redução do crescimento das cepas de *A. niger*, *C. albicans* e *B. subtilis* (em número de log) nas amostras de Água Boricada produzidas no laboratório e contaminadas artificialmente.

Tabela 18 – Resultados do teste de eficácia antimicrobiana nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório.

CEPA	INÓCULO INICIAL (cél/s/ml)	CONTAGEM DO INÓCULO (UFC/ml)											
		AMOSTRA A			AMOSTRA B			AMOSTRA C			AMOSTRA D		
		7 Dias	14 Dias	28 Dias	7 Dias	14 Dias	28 Dias	7 Dias	14 Dias	28 Dias	7 Dias	14 Dias	28 Dias
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,5 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	$1,3 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$	< 10	$3,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	$4,2 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	$6,6 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$
<i>E. coli</i> ATCC 8739	$7,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^2$	< 10	< 10	$3,2 \times 10^3$	< 10	< 10	$3,6 \times 10^5$	$3,4 \times 10^3$	< 10	$4,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2×10^5	$6,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	< 10	$5,8 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$	< 10	$5,7 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$
<i>A. niger</i> ATCC 16404	2×10^5	$3,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	20	$3,0 \times 10^3$	< 10	< 10	$8,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1×10^6	$5,7 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$	$6,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$

(A) Amostra de Água Boricada preparada com água destilada, pH 4,37.

(B) Amostra de Água Boricada preparada com água deionizada, pH 4,28.

(C) Amostra de Água Boricada preparada com água destilada, pH 7,00.

(D) Amostra de Água Boricada preparada com água deionizada, pH 7,00.

Tabela 19 - Redução do inóculo inicial, em número de log, no teste de eficácia antimicrobiana nas amostras de Água Boricada produzidas em laboratório.

CEPA	INÓCULO INICIAL (cél/ml)	REDUÇÃO DO INÓCULO (UFC/ml)											
		7 DIAS				14 DIAS				28 DIAS			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,5 \times 10^6$	6	6	3	1	(*)	(*)	4	2	(*)	(*)	6	5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	$4,2 \times 10^6$	6	6	1	SR	(*)	(*)	1	SR	(*)	(*)	2	1
<i>E. coli</i> ATCC 8739	$7,3 \times 10^6$	4	3	1	SR	6	6	3	SR	(*)	(*)	6	1
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2×10^5	1	1	1	SR	2	2	2	1	6	6	3	3
<i>A. niger</i> ATCC 16404	2×10^5	1	2	1	1	SR	5	SR	SR	4	(*)	SR	2
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1×10^6	2	2	1	1	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR

(A) Amostra de Água Boricada preparada com água destilada, pH 4,37.

(B) Amostra de Água Boricada preparada com água deionizada, pH 4,28.

(C) Amostra de Água Boricada preparada com água destilada, pH 7,00.

(D) Amostra de Água Boricada preparada com água deionizada, pH 7,00.

LOG = logarítmico.

SR = Sem redução (em relação à contagem anterior).

(*) = na contagem anterior ocorreu a redução total do inóculo e não aumentou no restante do período do teste.

Comparando os resultados da tabela 19 com os critérios para a eficácia antimicrobiana apresentados anteriormente (tabela 10), observou-se que as amostras A e B cumpriram com os critérios estabelecidos para a categoria 1 (produtos oftálmicos).

A amostra C não cumpriu com os critérios para produtos oftálmicos, visto que não reduziu o inóculo inicial de *P. aeruginosa*, conforme exigido pela monografia adotada.

A amostra D não cumpriu com os critérios estabelecidos para as categorias 1 e 2 (produtos oftálmicos e de uso tópico, respectivamente), apesar da segunda categoria exigir uma redução menor do inóculo inicial. Os níveis de redução não atingidos da categoria 1 foram para as cepas de *P. aeruginosa* e *E.coli* (7 dias), *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E.coli* (14 dias). Para a categoria 2, os níveis de redução das cepas de *P. aeruginosa* e *E.coli* (14 dias) também não foram atingidos.

5 DISCUSSÃO

A prevenção de doenças infecciosas é certamente preferível que o seu tratamento (Schein et al, 1992). Neste contexto, as amostras de Água Boricada foram avaliadas, a fim de verificar o uso deste produto em aplicações oftalmológicas e os possíveis riscos a que os usuários ficam expostos.

5.1 PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO

Os resultados dos protocolos de investigação comprovaram que a Água Boricada é utilizada pela população, pois 98,81% dos estabelecimentos pesquisados vendem o produto e 57,39% dos entrevistados já fizeram uso deste medicamento.

Nas pesquisas com a população, o índice de 42,42% para a aquisição do produto através de receituário médico demonstrou que o produto não deixou de ser recomendado para uso terapêutico, como indicado por Silva (1985). O fato foi reafirmado pela pesquisa com as farmácias e drogarias, cujo índice foi de 36,14%. Segundo Houlsby, Ghajar e Chavez (1986), o uso do ácido bórico tem sido sustentado por pesquisas científicas envolvendo preparações oftálmicas.

Campos (2003) descreveu que autores consideraram a possibilidade de extinção do uso do ácido bórico como medicamento, visto que há drogas mais eficazes. Entretanto, os índices obtidos com os resultados dos dois protocolos de investigação aplicados, indicaram que a ação terapêutica do produto foi apontada pelos estabelecimentos entrevistados como o principal fator que influencia na venda do produto (49,40%), enquanto 80,30% da população respondeu que obteve o resultado esperado com o uso do produto. Esses índices indicaram que existe uma crença sobre o valor terapêutico da Água Boricada. Além disso, Portellinha, Cai e Belfort Jr. (1983) descreveram que o produto vem sendo testado clinicamente em pacientes com blefarites, apresentando resultados positivos.

Em todas as faixas etárias foi elevado o índice de utilização da Água Boricada, indicando que a mesma não está em desuso, sendo seu uso difundido de geração em geração. O índice de 43,37% para a venda do produto pelas farmácias e

drogarias a partir da solicitação pelo cliente indicou que a Água Boricada é popular entre a população pesquisada. Este índice reafirma a descrição de *The Columbia Encyclopedia* (2003) que o produto é comumente utilizado em aplicações oftalmológicas.

A média de venda de 33 frascos/mês, em conjunto com os demais resultados descritos, evidenciaram que o produto na realidade não é obsoleto, conforme relatado por Korolkovas e Burckhalter (1982).

5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 Avaliação da Embalagem e Rótulo

Nas amostras analisadas, constatou-se diferença no tipo de material empregado na embalagem (tipo de plástico, coloração, tampa), o que poderia estar influenciando na estabilidade do produto, conforme descreveram Prista, Alves e Morgado (1996), Hecht (2000), Ansel, Popovich e Allen Jr (2000). Em contrapartida, foi observada uma diferença de prazos de validade estipulados pelos fabricantes.

Não há conhecimento dos critérios considerados pelos fabricantes para estipular o prazo de validade de seus produtos, embora os produtos comercializados apresentassem diferentes prazos de validade (de 12 a 48 meses), mesmo quando a formulação era basicamente a mesma, no que se refere ao tipo de água e ausência de conservante. Entretanto, outros fatores interferem na estabilidade e, conseqüentemente, no prazo de validade dos produtos, como pH da solução e adição de conservante, conforme descreveu Hecht (2000).

Constatou-se que existem embalagens sendo comercializadas sem atender à Legislação Sanitária Vigente (Brasil, 2000), pois o tipo de lacre utilizado por três fabricantes não garantiu a inviolabilidade do frasco. Desta forma, não há garantias de que o usuário adquira um frasco que não tenha sido aberto anteriormente e, conseqüentemente, com possibilidade de ter ocorrido alguma alteração no produto. Somando-se a isto, dois destes fabricantes utilizaram frascos opacos, que impede a rápida identificação de alterações, conforme alertaram Prista, Alves e Morgado (1996).

Por outro lado, a embalagem deve proteger o produto da incidência direta da luz (BP, 2002), o que não acontece quando frascos transparentes são empregados,

pois não há uma embalagem secundária envolvendo o frasco, como acontece com os colírios disponíveis no mercado.

A comercialização da Água Boricada em frasco de 1000ml pode representar um risco ao usuário. Esta apresentação fornece uma duração maior do produto e o usuário pode contaminá-lo durante o uso. A relação entre o tempo de uso e a contaminação dos frascos foi descrita por vários autores (Geyer et al., 1995; Prista, Alves e Morgado, 1996; Schellini et al., 2003; Kara José et al., 2003), reafirmando a necessidade de cumprir com o determinado por monografia oficial adotada no Brasil (BP, 2002), cujo volume máximo permitido é 200ml (a menos que o fabricante possua autorização).

Agravando este quadro, com exceção de um fabricante, que forneceu orientação ao usuário, não há instruções nos rótulos dos produtos quanto ao tempo máximo de uso do produto após abertura do frasco, contrariando a BP (2002) e a Farmacopeia Portuguesa (2002) e, tampouco, esclarecimento da forma correta de manusear o produto, conforme citado por Åslund, Oslon e Sandell (1978), a fim de evitar a contaminação durante o uso. Livingstone, Hanlon e Dyle (1998), possivelmente não observaram uma correlação entre o tempo de abertura e a contaminação dos frascos porque a avaliação realizada pelos autores foi com frascos de colírios utilizados em um hospital, ou seja, utilizados por profissional que certamente conhece a forma correta de manusear as preparações oftálmicas e a diferença entre os tempos de abertura avaliados foi pequena (7 e 14 dias).

Seewoodhary e Stevens (1999) sugeriram que o profissional médico que prescreve a medicação (ou o farmacêutico durante a dispensação) pode orientar a forma correta de utilizar o produto. Entretanto, através dos protocolos de investigação, constatou-se que 57,58% da população adquire a Água Boricada sem receituário médico e, muitas vezes, o medicamento é dispensado pelo atendente do balcão, sem a participação ativa do farmacêutico. Essas possibilidades deveriam ser consideradas pelos fabricantes, de maneira a garantir que o usuário tenha acesso a tais informações.

Observou-se que 48% dos fabricantes disponibilizaram escassas informações ao usuário, quanto à forma de utilização e armazenamento, o que pode comprometer a conservação do produto, conforme salientado por Schein et al. (1988), Ansel, Popovich e Allen Jr (2000).

Nos rótulos dos produtos, observou-se que as informações eram escassas, sendo considerado “ruim” o nível de informações prestadas por doze fabricantes (48%). A indicação de uso do produto é incompleta, fato também observado por Kara José et al. (2003). Diante desta situação, o usuário pode acabar utilizando o produto em situações de risco, que exigiriam uma rápida consulta ao oftalmologista, a fim de obter um diagnóstico preciso e evitar o agravamento do quadro patológico. Esta possibilidade foi levantada também por Ansel, Popovich e Allen Jr (2000), os quais salientaram que o uso indiscriminado de medicamento pode levar a complicações graves. Acrescentaram que as situações graves que não podem ser diagnosticadas ou tratadas com êxito pelo leigo não devem constar nos rótulos. Levando em consideração as indicações de uso constantes nos rótulos e a utilização por leigos, o uso da Água Boricada sem prescrição médica poderia mascarar sinais clínicos, dificultando o diagnóstico.

O uso oftalmológico foi indicado por 56% dos fabricantes. Apesar da Resolução RDC 277/02 (Brasil, 2002) restringir que as preparações oftálmicas não devem apresentar concentração de ácido bórico superior a 2%, existem no mercado produtos comercializados na concentração de 3%, constando claramente no rótulo a indicação para uso oftalmológico.

No rótulo dos demais fabricantes não há menção de que o produto não possa ser utilizado para a aplicação oftalmológica. Atualmente, não há nenhum regulamento ou monografia que exija que os rótulos de Água Boricada ostentem restrições para esta aplicação. Considerando que este medicamento é de uso popular, podendo ser adquirido sem receituário médico, a falta de indicações no rótulo do produto para o uso em aplicações oftalmológicas (ou sua restrição), deixa o consumidor livre para adquirir qualquer Água Boricada disponível no comércio e aplicá-la nos olhos.

O produto é utilizado após cirurgias, conforme comprovado através dos protocolos de investigação aplicados à população, onde 1,52% dos entrevistados utilizaram o produto nestas circunstâncias e a indicação por oftalmologista e cirurgião plástico após cirurgia de catarata e blefaroplastia (Schaefer, 2003; Freitas, 2004). Entretanto, a utilização de um produto contendo conservante em sua formulação pode afetar o processo de cicatrização, principalmente, em pacientes idosos, conforme descrito por Baudouin e Lunardo (1998) e por Furrer, Mayer e

Gurny (2002), pois os conservantes interferem na reepitelização da córnea (Hoffman et al., 1986, citado por Furrer, Mayer e Gurny (2002).

Um fabricante reconheceu a ausência de esterilidade do seu produto, ao colocar a inscrição “não estéril” no rótulo, embora tenha indicado claramente o seu produto para aplicação oftalmológica, desconhecendo ou ignorando o risco envolvido. Outros fabricantes preocuparam-se com a utilização de um produto contaminado, alertando o usuário que em determinadas alterações visuais observadas no produto, o mesmo não deve ser utilizado ou, ainda, orientando a forma de manuseio do frasco, a fim de evitar a contaminação do produto durante o uso. Äslund, Olson e Sandell (1978) salientaram a necessidade de instruções detalhadas para o manuseio dos frascos, a fim de evitar risco de contaminação das preparações oftálmicas quando utilizadas por pessoas sem experiência.

Em todas as literaturas pesquisadas (Silva, 1926; Lucas, 1959 e Prista e Alves, 1973), na formulação descrita para a Água Boricada, a concentração do ácido bórico está a 3% e o tipo de água recomendada é a destilada. Entretanto, existem no mercado produtos comercializados nas concentrações de 2 e 3%, preparados com água destilada e deionizada (há casos em que o fabricante não informa o tipo de água utilizada). A Resolução RDC nº 132/2003 (Brasil, 2003) prevê a isenção de registro para produtos cuja formulação esteja inscrita na Farmacopéia Brasileira (Silva, 1926), ou seja, para a Água Boricada a 3%. Considerando a legislação sanitária vigente, as apresentações a 2% deveriam estar sujeitas à obtenção de registro para comercialização. Entretanto, observou-se que nenhuma das amostras a 2% possuía registro junto ao Ministério da Saúde.

Diferenças nas formulações foram observadas também no que se refere à presença ou ausência de conservantes. Parece que o conservante não é importante na formulação da Água Boricada, pois apenas 7 fabricantes (28%) utilizaram tal componente, pressupondo que foi considerado desnecessário, devido a uma possível propriedade antimicrobiana intrínseca da solução, ou não está sendo dada a atenção merecida para a necessidade do conservante no produto, pois a embalagem de dose múltipla possibilita a contaminação durante o uso e o desenvolvimento de microrganismos, conforme relatado por Äslund, Olson e Sandell (1978), Prista, Alves e Morgado (1996), Hecht (2000), Sandman e Abelson (2002).

As Farmacopéias Européia (*Farmacopea Europea*, 1988), Britânica (BP, 2002) e Portuguesa (Farmacopeia Portuguesa, 2002) permitem que as formulações

de produtos acondicionados em embalagens de doses múltiplas não contenham conservantes nos casos em que a preparação possua propriedades antimicrobianas intrínsecas.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* apontaram o ácido bórico como uma substância com propriedades antimicrobianas: Poe e Charkey (1949), Fayinka (1971) citado por Sobel e Chaim (1997), Swate e Weed (1974), Watson e Duerden (1977), Van Slyke, Michel e Rein (1981), Houlsby, Ghajar e Chavez (1986, 1988), Meers e Chow (1990), Albuquerque, Cavalcanti e Aguiar (1992), Gauschino et al. (2001), Del Palácio et al. (2002), Ozcan et al. (2003). Entretanto, Wilson (1996) afirmou que mesmo as preparações com propriedades antimicrobianas intrínsecas devem ser mantidas sob refrigeração e descartadas após 7 dias. Tais recomendações não constavam nos rótulos das amostras analisadas.

Os conservantes utilizados pelos fabricantes foram metilparabeno e timerosal. Entre os fabricantes que optaram pelo metilparabeno (6), dois deles não informaram qual a concentração utilizada, não atendendo às determinações da *Farmacopeia Europea* (1988). Dois fabricantes empregaram uma concentração abaixo da indicada por Hecht (2000) e Furrer, Mayer e Gurny (2002). Além disso, Hecht (2000) descreveu que este tipo de conservante não é eficaz, sendo considerado pelo FDA como inadequado em preparações oftálmicas.

Diante de tais relatos, há a necessidade de avaliar os tipos de conservantes utilizados e sua concentração, a fim de cumprir com os requisitos descritos por Ansel, Popovich e Allen Jr (2000): impedir o crescimento dos microrganismos ou promover sua destruição, cuja ação deve ser rápida.

A concentração do conservante influencia na atividade antimicrobiana (Eriksen, 1970). Entretanto, Ansel, Popovich e Allen Jr. (2000) descreveram que a concentração do conservante depende de outros fatores, como a presença de outras substâncias na formulação com capacidade inerente de conservação. As águas boricadas disponíveis no comércio possuem concentrações de 2 e 3%, estando dentro da faixa de concentração, considerada por Van Slyke, Michel e Rein (1981), como inibitória para *C. albicans*.

Fato mais grave constatou-se com o fabricante que utilizou o timerosal, o qual foi apontado por Furrer, Mayer e Gurny (2002) como incompatível com o ácido bórico. Este fabricante não considerou um dos requisitos imprescindíveis na escolha do conservante: a compatibilidade com outros componentes da formulação,

conforme descrito por Gangrade et al., 1996, citado por Furrer, Mayer e Gurny (2002) e Ansel, Popovich e Allen Jr (2000).

5.2.2 Análise Microbiológica

Atualmente, a Água Boricada é fabricada e comercializada sem cumprir com a exigência da esterilidade, apesar da necessidade de que na preparação dos medicamentos oftálmicos tenha-se pelo menos os mesmos cuidados dispensados à fabricação de injetáveis, conforme destacado por Prista, Alves e Morgado (1992).

A Água Boricada, como está sendo fabricada e disponibilizada no comércio atualmente, pode constituir uma fonte de contaminação microbiológica, expondo o usuário ao risco de desenvolver algum tipo de infecção ocular, que pode trazer graves consequências.

Os resultados dos ensaios microbiológicos comprovaram a existência no comércio de Água Boricada contaminada microbiologicamente, apesar das farmacopéias exigirem a condição de esterilidade para todas as preparações de uso oftalmológico. A principal contaminação detectada foi causada por bolores e leveduras. Isto reafirma o relato de Prista e Alves (1973) que esta solução altera-se com frequência, devido ao crescimento de fungos.

Não foi possível relacionar a contaminação das amostras com o pH, teor, tipo de água utilizada, conservante e prazo de validade, possivelmente devido à variabilidade dos parâmetros e o número de amostras analisadas.

A contaminação das amostras pode ter sido originada nas matérias-primas (principalmente na água), nos frascos de acondicionamento do produto, no pessoal envolvido no processo de fabricação ou do ambiente, conforme descrito por Coad, Osato e Wilhelmus (1984) e Van Ooteghem (1995), citado por Furrer, Mayer e Gurny (2002).

A possibilidade de soluções oftálmicas contaminadas microbiologicamente desencadearem infecções oculares graves foi descrita por vários autores: Roizenblat e Inomata (1982), Adams et al. (1983), Mondino et al. (1986), Schein et al. (1988, 1992), Prista, Alves e Morgado (1990, 1996), Velasco e Bermudez (1996), Chibret (1997), Netto e Pereira (1998), Garg e Rao (1999), Klotz et al. (2000), Hecht (2000), Fernandes et al. (2000).

A presença de microrganismos nas amostras de Água Boricada não significa que o usuário venha a desenvolver algum tipo de infecção em decorrência do uso do produto, pois vários fatores estão envolvidos neste processo: grau de virulência do microrganismo, grau de contaminação, frequência de uso do produto, comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro (oculares e sistêmicos), presença de fagócitos na superfície da córnea, conforme descreveram Roizenblat e Inomata (1982) e Lima et al. (1995), citados por Netto e Pereira (1998). Segundo Ginsberg (1971), o ácido bórico em concentrações superiores a 2% e temperatura entre 37 e 40 °C, podem interferir no processo de fagocitose, o que indica a probabilidade da Água Boricada por si só diminuir o mecanismo de defesa do organismo. Segundo Abelson, Gifford e Chapin, (2002), os mecanismos físicos e químicos de defesa do organismo dificultam a penetração dos microrganismos, dificultando ou impedindo que os mesmos provoquem infecções em olhos íntegros e indivíduos saudáveis.

Entretanto, o produto pode vir a ser utilizado por usuários com quebra do epitélio corneal ou com doenças que facilitam o desenvolvimento de infecções, como diabete, AIDS, em situações de *stress*, por idosos, entre outros, que são mais suscetíveis às infecções (Pelczar et al., 1996; Klotz et al., 2000).

Foi constatado, através do protocolo de investigação aplicado à população, que 30,43% dos entrevistados utilizaram o produto nos olhos na forma de lavagem, permitindo o contato direto da Água Boricada com a mucosa ocular. A utilização de um produto contaminado constitui uma via direta de transmissão de microrganismos, conforme relataram Mims et al. (1999), podendo ocasionar sérias infecções aos olhos, sobretudo, na presença de quebra do epitélio ocular, conforme descreveram Lachman, Lieberman e Kanig (2001).

Schein et al. (1992) descreveram que pacientes que sofreram cirurgia ocular apresentam risco de infecções oculares severas. O produto é recomendado por médicos (Schaefer, 2003; Freitas, 2004) para uso pós-cirúrgico. O uso de uma Água Boricada contaminada pós-cirurgia poderia desencadear um processo infeccioso, como a endoftalmite, podendo levar o paciente a ter sérios danos irreversíveis, pois, nestas condições, as defesas do organismo muitas vezes são insuficientes para prevenir a perda da visão, conforme relataram Klotz et al. (2000) e Callegan et al. (2002).

O fato de não ter sido detectada a presença de determinados patógenos nas amostras não diminui o risco do produto vir a desenvolver algum tipo de dano ocular ao usuário, visto que existem outros microrganismos que podem ocasionar danos aos olhos, muitos classificados como não patogênicos.

É necessário considerar o risco de usuários de lentes de contato, que apresentem ruptura na barreira de proteção ocular, devido à dificuldade de inserção e remoção das lentes (Adams et al., 1983), utilizar um produto que não seja estéril e que possua grandes chances de apresentar algum tipo de contaminação microbiana. Em consequência, como relatou Garg e Rao (1999) e Miller (2000), qualquer microrganismo pode invadir a córnea, caso os mecanismos de defesa estejam comprometidos.

Outros fatores que reforçam a obrigatoriedade das preparações de uso oftálmico serem estéreis, é a probabilidade da contaminação microbiana provocar uma alteração físico-química na solução (conforme descreveram Kallings, Ringertz e Silverstolpe, 1966; Hecht, 2000) e a dos microrganismos mortos e seus metabólitos presentes na solução oftálmica desencadarem reações adversas (Roizenblat e Inomata, 1982).

Diante da possibilidade de microrganismos invadirem a córnea, é impossível discordar que a esterilidade seja fundamental nas formas farmacêuticas de administração ocular, conforme descrito por Roizenblat e Inomata (1982), Prista, Alves e Morgado (1990, 1992) e Hecht (2000).

Considerando a gravidade das doenças oculares e seu avanço rápido (podendo haver perda visual e do próprio olho), a necessidade de um rápido e correto diagnóstico (o qual depende muitas vezes de exames específicos e de difícil alcance pela população carente), é imprescindível monitorar e garantir que as preparações oftálmicas disponibilizadas no mercado sejam estéreis, para que estas não sejam causadoras de infecções oculares. O quadro torna-se mais grave quando pacientes idosos são vitimados por infecções oculares, pois muitas vezes demoram em se queixar e, quando o fazem, não é raro dependerem de outras pessoas para terem acesso à assistência médica, acarretando ainda mais atraso no diagnóstico e consequentemente, ao tratamento adequado e efetivo.

É necessário considerar também a população carente, que, além de estar mais suscetível às infecções em geral, inclusive oculares, devido às condições de

higiene e moradias precárias, tem ainda mais dificuldades para ter acesso à assistência médica e exames.

5.2.3 Ensaio Físico-químicos

Amostras com material em suspensão foram detectadas, possivelmente em decorrência de problemas no processo de fabricação ou na limpeza da embalagem utilizada para o acondicionamento do produto, conforme descrito por Hecht (2000).

Uma grande variação na faixa de pH das amostras analisadas foi observada. As amostras com pH próximo ao pH da lágrima (igual a 7,4) possivelmente são mais confortáveis para o usuário (Sandman e Abelson, 2002; Abelson, Gifford e Chapin, 2002). Entretanto, pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos (Barbosa e Torres, 1999).

Quatro amostras apresentaram pH abaixo de 4,0, o que pode provocar distorções no filme lacrimal, conforme descrito por Hecht (2000). Alterações no filme lacrimal podem comprometer o mecanismo de defesa ocular, permitindo a entrada de patógenos (Schaefer et al., 2001).

Porém, não há uma concordância entre os autores quanto ao valor mínimo de pH admissível para uma preparação oftálmica: Garcia (2002) relatou que pH fora da faixa de 6,6 a 9 provoca doenças; Prista, Alves e Morgado (1995) afirmaram que o pH das soluções oftálmicas deve estar dentro da faixa de 5 a 8,5. Considerando esta faixa, 37 amostras (78,72%) estão abaixo do limite mínimo descrito, as quais poderiam afetar de alguma forma a superfície ocular e seus mecanismos de defesa.

Prista, Alves e Morgado (1996) afirmaram que o pH influencia consideravelmente na estabilidade das soluções oftálmicas. Segundo Hecht (2000), o pH deve proporcionar uma boa estabilidade para a droga. Através dos ensaios, constatou-se uma variação nos valores de pH das amostras, o que poderia estar proporcionando diferente estabilidade para os produtos, o que, em parte, justificaria a diferença nos prazos de validade observados.

Campos (2003) descreveu que o ácido bórico é absorvido pela mucosa. A absorção pode ser maior nos olhos que sofreram cirurgia (Ueno, Refojo e Abelson, 1994, citado por Abelson, Gifford e Chapin, 2002). Baseado na pesquisa realizada por Small et al. (1997), na qual os autores comprovaram que o pH influencia na absorção das drogas, é necessário considerar a variabilidade dos valores de pH

encontrados nas amostras analisadas, associando com um possível aumento da absorção ocular do ácido bórico e, conseqüentemente, da toxicidade sistêmica.

Algumas amostras não apresentaram precisão da composição, o que poderia afetar a possível ação terapêutica do produto, a eficácia antimicrobiana, alterando o pH da formulação, interferindo na estabilidade e no conforto do usuário, conforme relataram Prista, Alves e Morgado (1990).

5.3 EFICÁCIA ANTIMICROBIANA

Os resultados do teste mostraram que o crescimento de todas as cepas testadas foi afetado pelas amostras de Água Boricada na concentração de 3%, comprovando que o ácido bórico é um agente antisséptico, conforme descrito por Korolkovas e Burckhalter (1982).

No teste realizado, verificou-se que as quatro amostras de Água Boricada testadas apresentaram efeito bacteriostático frente à cepa de *B. subtilis*. Este microrganismo, largamente distribuído no meio ambiente (água, poeira, etc), caso esteja presente em uma amostra de Água Boricada, poderá desencadear uma infecção ocular, de acordo com as descrições de Prista, Alves e Morgado (1996) e Fernandes et al. (2000).

Mingoia (1967), Harvey (1986) e Parfitt (1999) afirmaram que o ácido bórico em solução concentrada (em torno de 5%), possui propriedades bacteriostática e fungistática. No teste desenvolvido, os resultados da pesquisa mostraram que a solução de ácido bórico a 3% (pH ácido) também possui propriedades bacteriostática e fungistática frente às cepas dos microrganismos testadas.

Observou-se que tanto o tipo de água utilizada para o preparo da Água Boricada quanto o pH final da amostra interferiram na eficácia antimicrobiana, frente às cepas de microrganismos testadas. Os resultados indicaram que em pH baixo, o tipo de água utilizada interferiu menos na eficácia antimicrobiana que no pH neutro.

Comprovou-se que a eficácia da substância depende do pH e do tempo de contato com os microrganismos, estando em concordância com o relato de Korolkovas e Burckhalter (1982). Os resultados obtidos estão de acordo com o teste realizado por Anderson e Crompton (1967), quando verificaram que a destruição das bactérias é influenciada pelo pH, aumentando quando o pH se afasta de 7,0.

Variando o pH da solução, a concentração do ácido bórico e o tamanho do inóculo, não é possível prever em que nível o crescimento dos microrganismos será afetado. Em pesquisas anteriores, conduzidas por Houlsby, Ghajar e Chavez (1988), não foi observada uma proporcionalidade quando o tamanho do inóculo foi alterado.

5.4 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS COM OS RESULTADOS DO TESTE DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA

Os resultados demonstraram que as amostras de Água Boricada preparadas no laboratório com pH 7,0 (amostras C e D) não possuem atividade antimicrobiana intrínseca, permitindo o crescimento de vários patógenos. Desta forma, as amostras disponíveis no comércio com pH neutro (amostras 9, 14, 20, 22, 38, 41 e 43) possivelmente não possuem atividade antimicrobiana intrínseca, colocando em risco o usuário, pois os frascos são dose múltipla e não há descrição nos rótulos do acréscimo de conservante na formulação.

O teste de eficácia antimicrobiana mostrou que os produtos cuja concentração de ácido bórico seja 3% e com valor de pH em torno de 4,3, possivelmente apresentam atividade antimicrobiana intrínseca.

Para os produtos disponíveis comercialmente que possuem concentração de ácido bórico abaixo de 3% e valores de pH diferentes daqueles das amostras testadas (preparadas no laboratório), não é possível afirmar que os mesmos possuam atividade antimicrobiana intrínseca.

Entretanto, é importante registrar que Lakkis e Fleiszig (2001) questionaram resultados deste tipo de teste, devido a vários fatores, tal como o fato de que somente uma cepa de cada espécie é testada. Os resultados obtidos por outros autores sugerem a procedência de tal questionamento: Meers e Chow (1990), descreveram a diferença de suscetibilidade entre cepas de *P. aeruginosa* frente a uma solução de ácido bórico a 1%, onde somente uma cepa foi eliminada entre as 17 cepas testadas.

Desta forma, essas considerações devem ser lembradas ao se pensar em formular uma Água Boricada, em embalagens de dose múltipla sem conservante, não partindo do pressuposto que o produto possui atividade antimicrobiana intrínseca para todos os microrganismos.

Importante também registrar que o conservante não deve ser utilizado para obter uma solução estéril e tampouco para substituir as Boas Práticas de Fabricação, conforme descrito por Hecht (2000) e USP 25 (2002).

6 CONCLUSÕES

Neste capítulo, apresentam-se as conclusões extraídas com a realização da pesquisa e indicam-se as propostas de desenvolvimento de novos trabalhos, nessa mesma linha de avaliação de tecnologia em saúde.

Por meio dos protocolos de investigação aplicados à população e nas farmácias e drogarias, conclui-se que a Água Boricada é um produto popular, utilizado, principalmente, para aplicação oftalmológica e continua sendo prescrita por oftalmologistas, necessitando de um controle rígido durante a fabricação do produto, a fim de evitar a contaminação do mesmo e, conseqüentemente, colocar em risco a saúde da população.

Os resultados mostraram que um elevado índice de estabelecimentos vendem a Água Boricada, sendo a ação terapêutica do produto o principal fator que influencia na venda, a qual ocorre em maior frequência a pedido do cliente.

Os resultados dos procedimentos experimentais mostraram a situação crítica dos produtos que estão sendo comercializados, pois, entre os parâmetros avaliados, 63,83% das amostras analisadas deixaram de cumprir com um ou mais requisitos exigidos para as preparações oftálmicas, devido à: falta de precisão na composição, presença de material em suspensão, contaminação microbiológica e acondicionamento em frascos de grande volume, constituindo um risco para o usuário. A utilização da Água Boricada, da forma como se encontra no comércio, onde a condição de esterilidade não é exigida, deve ser um assunto de preocupação para a Saúde Pública.

Agravando esta situação, os rótulos da Água Boricada ostentam poucas informações aos consumidores, sendo imprescindível que os fabricantes dediquem atenção especial aos dizeres de rotulagem, a fim de promover o uso correto do medicamento, evitando a utilização inadequada do mesmo, o que pode desencadear graves conseqüências ao usuário, devido à falta de instruções sobre os cuidados de conservação e de manuseio do frasco, contra-indicações do produto, aplicações, entre outros.

Isto demonstra a importância do acompanhamento por parte do Ministério da Saúde, no que se refere à fiscalização nas indústrias farmacêuticas, elaboração e atualização de legislações, bem como na educação da população, com o objetivo de fornecer instruções claras para evitar a contaminação dos produtos durante a administração e também dos riscos de uma automedicação.

Considerando a exigência da esterilidade para *todos* os medicamentos de uso oftálmico; o risco que as soluções oftálmicas contaminadas podem ocasionar aos olhos do usuário; a comprovação da existência de produtos disponíveis no comércio, contaminados microbiologicamente, inclusive com indicação no rótulo para uso oftalmológico; a comprovação que na atualidade o local de aplicação mais frequente para o produto são os olhos; a possibilidade do produto ser utilizado diretamente nos olhos após cirurgia e por usuários de lentes de contato, os quais podem apresentar ruptura no epitélio corneal, facilitando a penetração de microrganismos; a comprovação da utilização da Água Boricada pela população para o cuidado de lentes de contato; e a comprovação de Água Boricada, cuja formulação não cumpre com os critérios de eficácia antimicrobiana inerente ao produto; torna-se imprescindível que a Água Boricada utilizada para uso oftalmológico seja estéril, com indicação clara no rótulo do produto se o mesmo pode ou não ser utilizado nos olhos, com instruções claras quanto à forma de utilização e cuidados no manuseio do produto. É de extrema importância que constem instruções no rótulo quanto à validade do produto após abertura do frasco.

Concluiu-se, ainda, que a Água Boricada pode apresentar uma eficácia antimicrobiana intrínseca, dependendo da formulação. Constatou-se que o tipo de água utilizado na preparação do produto interfere nesta propriedade, porém, na literatura, não foram encontradas informações sobre esta questão.

É necessário regulamentar a fabricação e comercialização do medicamento em questão para fins oftalmológicos, no que se refere à rotulagem, formulação (tipo de água utilizada, pH final do produto, tipo de conservante utilizado e concentração), acondicionamento (tamanho do frasco, utilização de frascos estéreis) e o emprego de técnicas assépticas durante todo o processo de fabricação. Ou seja, a Água Boricada para aplicação oftalmológica deve ser fabricada com os mesmos cuidados e exigências de outros medicamentos de uso oftálmico.

Na adoção dos procedimentos citados, a Água Boricada fatalmente terá um aumento de custo de produção, que, conseqüentemente, será repassado para o

valor final do produto. Entretanto, é necessário considerar que mesmo assim terá um custo menor do que o tratamento de uma infecção, a qual pode ocasionar danos irreversíveis ao usuário.

6.1 TRABALHOS FUTUROS

No desenvolvimento desta pesquisa, verificou-se visualmente que são utilizadas embalagens de polietileno de diferentes tipos pelos fabricantes.

O tipo de frasco escolhido para o envase de soluções oftálmicas não deve ceder substâncias às soluções e nem absorver delas constituintes, em especial os conservantes, o que irá comprometer a conservação do produto (Prista, Alves e Morgado, 1996) e, em consequência, sua eficácia e segurança.

Em 2001, o FDA solicitou o recolhimento do mercado americano de um lote de solução de lavagem dos olhos, contendo ácido bórico, visto que o produto estava contaminado com fenol, proveniente da embalagem, que migrou para a solução, através da parede do frasco (FDA, 2004).

Considerando a importância de que o material empregado na fabricação da embalagem seja inerte (Roizenblat e Inomata, 1982) e a possibilidade do mesmo estar cedendo substâncias tóxicas ao produto (ou absorvendo constituintes da solução), é importante avaliar a qualidade do material dos frascos utilizados no acondicionamento da Água Boricada.

Como a diferença do tipo de frasco utilizado para o envase pode afetar a estabilidade do produto (Prista, Alves e Morgado, 1996; Hechet, 2000; Ansel, Popovich e Allen Jr., 2000), é importante avaliar em que nível a coloração e o grau de transparência do frasco influenciam na estabilidade da Água Boricada, relacionando com a formulação (concentração de ácido bórico, uso de conservante) e o prazo de validade máximo aceitável.

Considerando que a concentração do princípio ativo influencia na ação terapêutica, é de interesse avaliar a eficácia terapêutica da Água Boricada, nas diferentes concentrações em que vem sendo comercializada.

O pH influencia na eficácia antimicrobiana do produto (conforme comprovado no desenvolvimento desta pesquisa), no conforto do usuário (Sandman e Abelson, 2002; Abelson, Gifford e Chapin, 2002), na estabilidade das soluções (Prista, Alves e Morgado, 1996) e na absorção das drogas. Como as amostras de Água Boricada

analisadas apresentaram uma grande variação de pH, uma pesquisa com diferentes valores de pH no produto poderá mostrar as variações na eficácia antimicrobiana e dos efeitos no organismo (através de testes *in vivo*), buscando definir uma faixa de pH para a Água Boricada, a fim de propiciar um aumento da eficácia, uma diminuição de possíveis efeitos tóxicos (pela diminuição da absorção), um aumento da estabilidade do produto, não esquecendo do conforto do usuário. Esta pesquisa é de grande interesse na tecnologia em saúde, visto que os avanços científicos devem buscar uma melhoria na qualidade dos medicamentos.

REFERÊNCIAS

- Abelson MB, Gifford S, Chapin M. Pharmacokinetics: What You Need to Know. Review of Ophthalmology [serial online] 2002 [citado 15 Jan. 2002]; 9:01. Não paginado. Available from: http://www.revophth.com/index.asp?page=1_6.htm. Acesso em 22 jan. 2004.
- Abelson MB, McGarr PJ. Update on bacterial conjunctivitis. Review of Ophthalmology [serial online] 1998. Available from: <http://www.revophth.com/1998/rpj8ttops.html>. Acesso em 12 dez. 2003.
- Abelson MB, Udell IJ, Weston JH. Normal Human Tear pH by Direct Measurement. Arch Ophthalmol 1981 Feb; 99: 301.
- Adams JR CP, Cohen EJ, Laibson PR, Galentine P, Arentsen JJ. Corneal Ulcers in Patients with cosmetic extended-wear contact lenses. Am J Ophthalmology 1983 Dec; 96(6): 705-9.
- Albuquerque SSMC, Cavalcanti MAQ, Aguiar LAB. Inhibitory effect of boric acid on the development and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Boletín Micológico 1992; 7(1-2): 55-7.
- Anderson K, Crompton D. A test for the bactericidal activity of eye-drops. The Lancet 1967; 290 (7523): 968-70.
- Ando N, Takatori K. Fungal flora of the conjunctival sac. [Abstract] Am J Ophthalmol 1982 Jul; 94(1):67-74.
- Ansel HC, Popovich NG, Allen Jr LV. Farmacotécnica. Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. São Paulo: Premier; 2000. 568p.
- Aristoteli LP, Bojarski B, Willcox MDP. Isolation of conjunctival mucin and differential interaction with *Pseudomonas aeruginosa* strains of varied pathogenic potential. Experimental Eye Research 2003; 77: 699-710.
- Äslund B, Olson OT, Sandell E. Studies on in-use microbial contamination of eyedrops. Acta Pharm Suec 1978; 15 (5): 389-94.
- Barbosa HR, Torres BB. Nutrição e Metabolismo Bacteriano. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeia JAN. Microbiologia. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 30.
- Baudouin C, Lunardo C. Short term comparative study of topical 2% carteolol with and without benzalkonium chloride in healthy volunteers. Br J Ophthalmol 1998; 82: 39-42.

Bendig JW, Kyle PW, Giangrande PLF, Samson DM, Azadian BS. Two neutropenic patients with multiple resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia treated with ciprofloxacin. J Roy Soc Med 1987; 80: 316-7.

Bennett JE. Infecções por fungos. In: Braunwald et al. Harrison. Medicina Interna. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. vol 1. p. 690.

Benz MS, Scott IU, Flynn JR HW, Unonius N, Miller D. Endophthalmitis Isolates and Antibiotic Sensitivities: A 6-year Review of Culture-proven Cases. Am J Ophthalmol 2004 Jan; 137 (1): 38-42.

Bernardis F, Mühlshlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. The pH of the Host Niche Controls Gene Expression in and Virulence of *Candida albicans*. Infection and Immunity 1998 Jul; 66 (7): 3317-25.

Biblioteca Virtual. Divisão Político-Administrativa – Mapas Brasil/Mapa 09.jpg. Disponível em:
http://www.icepa.com.br/virtualweb/MAPAS/BRASIL/images/Mapa09_jpg.htm
Acesso em 04 jan. 2005.

Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. Br J Ophthalmol 2003; 87: 834-8.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 92, de 23 de outubro de 2000. Modifica a Resolução ANVS nº 510, de 1º de outubro de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, 26 out. 2000.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 132, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 277, de 22 de outubro de 2002. Dispõe sobre a proibição do uso do ácido bórico a todas as formas farmacêuticas de medicamentos anti-sépticos de uso tópico indicados para uso infantil e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 23 out. 2002.

British Pharmacopoeia. London: The Stationery Office; 2002. vol 2. A322-3. p.1867-9.

Brodsky MH, Ciebin BW, Schiemann DA. Simple bacterial preservation medium and its application to proficiency testing in water bacteriology. Applied and Environmental Microbiology 1978 Mar; 35 (3): 487-91.

Callegan MC, Engel LS, Hill JM, O'Callaghan RJ. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. [Abstract] Infect Immun 1994 Jun; 62 (6): 2478-82.

Callegan MC, Engelbert M, Parke II DW, Jett BD, Gilmore MS. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. Clinical Microbiology Reviews 2002 Jan; 15 (1): 111-24.

Campos S. Intoxicação por boratos.2003. Disponível em:
www.drashirleydecampos.com.br/noticias.php?noticiaid=1649&assunto=Intoxicações. Acesso em 26 nov. 2003.

Cardoso LSP, Tessari ENC, Castro AGM, Kanashiro AMI. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. Arquivos Instituto Biológico [serial online] 2000 Jan-Jun;67 (1). Disponível em:
http://www.biologico.sp.gov.br/arquivos/v67_1/pesquisa_salmonella.htm. Acesso em 14 set. 2003.

Chibret H. Conservateurs et préparations ophtalmiques: réalités et perspectives. Ann Pharm Fr 1997; 55 (5): 228-31.

Coad CT, Osato MS, Wilhelmus KR. Bacterial contamination of eyedrop dispensers. Am J Ophthalmol 1984; 98: 548-51.

Dart JKG, Stapleton F, Minassian D. Contact lenses and other risk factors in microbial keratitis. Lancet 1991; 338: 650-3.

Davis LJ. Tap water vs. saline rinsing of rigid gas permeable contact lenses – comparative case contamination: a pilot study. ICLC 1996 Sep/Oct; 23: 177-82.

Dawson NL, Reinhardt DJ. Microbial Flora of In-Use, Display Eye Shadow Testers and Bacterial Challenges of Unused Eye Shadows [Abstract]. Applied and Environmental Microbiology 1981 Aug; 42 (2): 297-302.

Del Palacio A, Cuétara MS, López-Suso MJ, Amor E, Garau M. Randomized prospective comparative study: short-term treatment with ciclopiroxolamine (cream and solution) versus boric acid in the treatment of otomycosis. Mycoses 2002; 45(8): 317-28.

Dougherty JM, McCulley JP. Comparative bacteriology of chronic blepharitis. Br J Ophthalmol 1984; 68: 524-8.

Dunn JP, Mondino BJ, Weissman BA. Corneal Ulcers Associated with Disposable Hydrogel Contact Lenses. Am J Ophthalmol 1989; 108:113-7.

Eifrig CWG, Scoot IU, Flynn HW, Miller D. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Ophthalmology 2003 Sep; 110 (9): 1714-7.

Eriksen SP. Preservation of ophthalmic, nasal & otic products. Drug Cosmet Ind 1970; 107: 36-40.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu; 1988.

Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira; 1959. p.48.

Farmacopea Europea. 2.ed. Madrid: Publicaciones, Documentación y Biblioteca del Ministerio de Sanidad y Consumo; 1988. parte II. vol.1. p.28.

Farmacopeia Portuguesa. 7.ed. Lisboa: Rainho & Neves Ltda; 2002. vol.1. p.138-9; 622-3.

FDA. Recalls and Field Corrections: Drugs – Class II. Available from: <http://www.fda.gov/bbs/topics/ENFORCE/2001/ENF00675.html>. Acesso em 03 out. 2004.

Fernandes AT, Ribeiro Filho N, Mazzano RS, Santana LB, Cerbara EFV, Cassaro JR E. Bactérias Aeróbias. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde. São Paulo: Atheneu; 2000. vol 1. p. 336-82.

Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. 302p.

Fleiszig SMJ, Zaidi TS, Ramphal R, Pier GB. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* Adherence to the Corneal Surface by Mucus. Infection and Immunity 1994 May; 62 (5): 1799-804.

Foster CS. Fungal keratitis. Infect Dis Clin N Am 1992; 6 (4):851-7.

Franzetti F, Cernuschi M, Esposito R, Moroni M. *Pseudomonas infections* in patients with AIDS and AIDS-related complex. J Intern Med 1992; 231: 437-43.

Frazier WC, Westhoff DC. Microbiologia de los alimentos. 4.ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 2000. 681 p.

Freitas AG. Cirurgia das pálpebras/ blefaroplastia. Disponível em: <http://www.cirurgiaestetica.com.br/cirurgia/estetica/recomendacoes/blefaroplastia.htm>. Acesso em 11 dez. 2004.

Furrer P, Mayer JM, Gurny R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2002; 53: 263-80.

Garcia JM. Los colirios. Revista Mexicana de Oftalmologia 2002; 76 (1). Disponível em: http://www.smo.org.mx/medicos/3000_76_1_Colirios.asp. Acesso em 11 nov. 2003.

Garg P, Rao GN. Corneal Ulcer: Diagnosis and Management. Community Eye Health 1999; 12 (30): 21-3.

Gauschino S, Seta F, Sartore A, Ricci G, Santo D, Piccoli M et al. Efficacy of maintenance therapy with topical boric acid in comparison with oral itraconazole in the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol 2001; 184(4): 598-602.

Geyer O, Bottone EJ, Podos SM, Schumer RA, Asbell PA. Microbial contamination of medications used to treat glaucoma [Abstract]. Br J Ophthalmol 1995; 79: 376-9.

Ginsberg F. Boric Acid mystery: Why does anyone still use it? Medicine and Pharmacy. Modern Hospital 1971; 117 (2): 140.

Gombos GM. Manual de Emergências Oftalmológicas: guia para as emergências em oftalmologia. 2.ed. São Paulo: Manole; 1979.p. 53-60.

Gompertz OF, Gambale W, Paula CR, Correa B. Biologia dos Fungos. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeia JAN. Microbiologia. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 1999a. p. 373-4.

Gompertz OF, Gambale W, Paula CR, Correa B. Micoses oportunistas e outras micoses. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeia JAN. Microbiologia. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 1999b. p. 413-5.

Guerrant RL. Infecções por *Salmonella*. In: Braunwald et al. Harrison. Medicina Interna. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. vol. 1. p. 558.

Harte VJ, O'Hanrahan MT, Timoney R. Microbial contamination in residues of ophthalmic preparations [Abstract]. Int J Pharmaceut 1978; 1:165-71.

Harvey SC. Antissépticos e Desinfetantes; Fungicidas; Ectoparasiticidas. In: Gilman AG, Goodman LS, Gilman A. As bases Farmacológicas da Terapêutica. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986. vol. 2. p.846-50.

Hecht G. Ophthalmic Preparations. In: Gennaro AR. Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20thed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 821-35.

Hemady RK. Microbial Keratitis in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. Ophthalmology 1995; 102:1026-30.

Houlsby RD, Ghajar M, Chavez GO. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1986 May; 29 (5): 803-6.

Houlsby RD, Ghajar M, Chavez GO. Microbiology characteristics of unpreserved saline. Journal of the American Optometric Association 1988; 59 (3/88): 184-8.

Hyndiuk RA, Eiferman RA, Caldwell DR, Rosenwasse GO, Santos CI, Katz HR et al. Comparison of Ciprofloxacin Ophthalmic Solution 0.3% to Fortified Tobramycin-Cefazolin in Treating Bacterial Corneal Ulcers. Ophthalmology 1996; 103: 1854-63.

IPPUC. Mapa das Regiões Administrativas de Curitiba. Guia Geográfico de Curitiba. Prefeitura de Curitiba. Disponível em:
<http://www.curitiba-parana.com/geografia-mapas/mapa-regionais.htm>. Acesso em 11 nov. 2004.

Irvine WD, Flynn HW, Miller D, Pflugfelder SC. Endophthalmitis Caused by Gram-negative Organisms. Arc Ophthalmol 1992 Oct; 110: 1450-4.

- Jeng BH, McLeod SD. Microbial keratitis. *Br J Ophthalmology* 2003;87:805-6.
- Jovanovic R, Congema E, Nguyen HT. Antifungal Agentes vs. Boric Acid for Treating Chronic Mycotic Vulvovaginitis. *The Journal of Reproductive Medicine* 1991; 36 (8): 593-7.
- Justiz GM, Boada RM. El ácido bórico como preservativo de las muestras de orina para el estudio bacteriológico. *Rev Cub Med* 1985; 24: 209-17.
- Kallings LO, Ringertz O, Silverstolpe L. Microbial contamination of medical preparations. *Acta Pharm Suecica* 1966; 3: 219-28.
- Kanski JJ. *Oftalmologia Clínica: uma abordagem sistemática*. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.74; 77;104.
- Kara José AC, Castelo Branco B, Ohkawara LE, Yu MCZ, Höfling-Lima AL. Condições de uso e ocorrência de contaminação de Água Boricada. In: 32º Congresso Brasileiro de Oftalmologia; 2003: 66 (4) [Painel]. Disponível em: <http://www.abonet.com.br/abo/664s/painel05.htm>. Acesso em 03 maio 2004.
- Kattan HM, Flynn HW, Plugfelder SC, Robertson C, Forster RK. Nosocomial Endophthalmitis Survey: current incidence of infection after intraocular surgery. *Ophthalmology* 1991; 98 (2):227-38.
- Kielhofner M, Atmar RL, Hamill RJ, Musher DM. Life-threatening *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 403-11.
- Killingsworth DW, Stern GA, Driebe WT, Knapp A, Dragon DM. Results of Therapeutic Penetrating Keratoplasty. *Ophthalmology* 1993; 4 (100): 534-41.
- Klotz SA. Fungal adherence to the vascular compartment: a critical step in the pathogenesis of disseminated candidiasis [Abstract]. *Clin Infect Dis* 1992 Jan; 14(1): 340-7.
- Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and Parasitic Infections of the Eye. *Clinical Microbiology Reviews* 2000 Oct; 13 (4): 662-85.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell Jr VR, Sommers HM. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 2.ed. São Paulo: Medica Panamerica; 1993.
- Korolkovas A. *Análise Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. p.115.
- Korolkovas A, Burckhalter J. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois; 1982. p. 523.
- Kunimoto DY, Sharma S, Garg P, Gopinathan U, Miller D, Rao GN. Corneal ulceration in the elderly in Hyderabad, South India. *Br J Ophthalmol* 2000 Jan; 84: 54-9.

Lachman L, Lieberman HÁ, Kanig JL. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 2001. vol 2. p.1081.

Lakkis C, Fleiszig SMJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Hydrogel Contact Lens Disinfection Correlates with Cytotoxic Activity. Journal of Clinical Microbiology 2001 Apr; 39 (4): 1477-86.

Leck AK, Thomas PA, Hagan M, Kaliamurthy J, Ackuaku E, John M et al. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and South India, and epidemiology of fungal keratitis. Br J Ophthalmol 2002; 86: 1211-5.

Leibowitz HM. Antibacterial Effectiveness of Ciprofloxacin 0.3% Ophthalmic Solution in the Treatment of Bacterial Conjunctivitis. Am J Ophthalmol 1991 Oct; 112: 29S-33S.

Lemp MA, Hamill JR. Factors Affecting Tear Film Breakup in Normal Eyes. Arch Ophthalmol 1973 Feb; 89: 103-5.

Litoral Virtual. Farmácias têm falta de remédio. São Paulo; 2003 mar 19: 744. Disponível em: <http://www.litoralvirtual.com.br/noticias/2003/03/19.html#3> Acesso em 18 nov. 2003a.

Litoral Virtual. Litoral Norte tem surto de conjuntivite. São Paulo; 2003 mar 19: 744. Disponível em: <http://www.litoralvirtual.com.br/noticias/2003/03/19.html#3>. Acesso em 18 nov. 2003b.

Livingstone DJ, Hanlon GW, Dyke S. Evaluation of an extended period of use for preserved eye drops in hospital practice. Br J Ophthalmol 1998 May; 82: 473-5.

Locksley RM. *Estafilococcias*. In: Braunwald et al. Harrison. Medicina Interna. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. Vol.1. p. 502.

Lucas V. Formulário Médico Farmacêutico Brasileiro. 2.ed. Rio de Janeiro: Científica; 1959. p. 21.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes and Infection 2000; 2: 1051-60.

Martins LT. Staphylococcus. In: Trabulsi Lr, Alterthum F, Gompertz Of, Candeia Jan. Microbiologia. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 1999. cap.18. p. 149.

Masinick SA, Montgomery CP, Montgomery PC, Hazlett LD. Secretory IgA Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Binding to Cornea and Protects Against Keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997 Apr; 38 (5): 910-18.

Masur H, Fauci AS. Infecções no hospedeiro comprometido. In: Braunwald et al. Harrison. Medicina Interna. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. vol.1. p. 435.

McCulley JP, Dougherty JM, Bacterial aspects of chronic blepharitis [Abstract]. Trans Ophthalmol Soc UK 1986; 105: 314-8.

McCulley JP, Dougherty JM, Deneau DG. Classification of Chronic Blepharitis. Ophthalmology 1982 Oct; 89 (10):1173-80.

McLeod SD, LaBree LD, Tayyanipour R, Flowers CW, Lee PP, McDonnell PJ. The Importance of Initial Management in the Treatment of Severe Infectious Corneal Ulcers. Ophthalmology 1995;102:1943-8.

Meers PD; Chow CK. Bacteriostatic and bactericidal actions of boric acid against bacteria and fungi commonly found in urine. J Clin Pathol 1990; 43: 484-7.

Mekalanos JJ. Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria. J Bacteriol 1992; 174:1-7.

Mendes AG. O que fazer quando a conjuntivite ataca? [citado em 06 ago. 2001a]. Disponível em:
http://www.escelsanet.com.br/sitesaude/artigos_cadastrados/artigo.asp?art=334
Acesso em 29 ago. 2004.

Mendes AG. Como tratar a conjuntivite bacteriana? [citado em 05 set. 2001b]. Disponível em:
http://www.escelsanet.com.br/sitesaude/artigos_cadastrados/artigo.asp?art=361
Acesso em 29 ago. 2004.

Miller WL. Pseudomonas Keratitis. Clinical Eye and Vision Care 2000; 12: 181-3.

Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Williams R. Microbiologia Médica. 2.ed. Espanha: Manole; 1999, 584p.

Mingoia Q. Química Farmacêutica. São Paulo: Edições Melhoramentos; 1967. p. 497.

Mishra GS, Mehta N, Pal M. Chronic bilateral otomycosis caused by *Aspergillus niger*. Mycoses 2004; 47: 82-4.

Mondino BJ, Weissman BA, Farb MD, Pettit TH. Corneal Ulcers Associated with Daily-Wear and Extended-Wear Contact Lenses. Am J Ophthalmol 1986; 102: 58-65.

Murphy JT, Allen HF, Mangiaracine AB. Preparation, sterilization, and preservation of ophthalmic solutions. A.M.A. Archives of Ophthalmology 1955 Jan; 53(1): 63-78.

Musch DC, Sugar A, Meyer RF. Demographic and Predisposing Factors in Corneal Ulceration. Arch Ophthalmol 1983; 101: 1545-8.
Netto AA, Pereira FJ. Avaliação da contaminação bacteriana de produtos oftálmicos. Rev Bras Oftal 1998; 57(10): 775-80.

Noecker R. Effects of common ophthalmics preservatives on ocular health [Abstract]. Advances in Therapy 2001 Sep/Oct; 18(5): 205-15.

- O'Brien TP, Maguire MG, Fink NE, Alfonso E, McDonnell P. Efficacy of Ofloxacin vs Cefazolin and Tobramycin in The Therapy for Bacterial Keratitis. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1257-65.
- Oldham GB, Andrews V. Control of microbial contamination in unpreserved eyedrops. *Br J Ophthalmology* 1996; 80: 588-91.
- Otero L, Fleites A, Méndez FJ, Palacio V, Vázquez F. Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Female Prostitutes with Vulvovaginitis to Antifungal Agents and Boric Acid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:59-61.
- Ozcan KM, Ozcan M, Karaarslan A, Karaarslan F. Otomycosis in Turkey: predisposing factors, aetiology and therapy. *The Journal of Laryngology and Otology* 2003 Jan; 117 (1): 39-42.
- Parfitt K. Martindale: The Complete Drug Reference. 32nded. London: Pharmaceutical Press; 1999. p.1554.
- Pelczar Jr MJ, Chan ECS, Krieg NR, Edwards DD, Pelczar MF. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2.ed. São Paulo: Makron Books; 1996. vol. 2. p. 42-7.
- Penland RL, Wilhelmus KR. Microbiologic analysis of bottled water. Is it safe for use with contact lenses? *Ophthalmology* 1999 Aug; 106 (8): 1500-3.
- Petersdorf RG, Root RK. Avaliação das doenças infecciosas. In: Braunwald et al. Harrison. *Medicina Interna*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. vol.1. p. 426.
- Pinna A, Zanetti S, Sotgiu M, Sechi LA, Fadda G, Carta F. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:771-3.
- Poe CF, Charkey LW. A study of boric acid media for the separation of *Escherichia* and *Aerobacter*. *J Bacteriol* 1949 Mar; 57 (3): 386-7.
- Portellinha WM, Cai S, Belfort Jr R. Avaliação clínica e laboratorial do uso de substancia emoliente e detergente nas blefarites ciliares. *Arq Bras Oftalmol* 1983; 46 (5): 134-7.
- Prista LN, Alves AC. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 1973. vol. 2. p. 1248-9.
- Prista LVN, Alves AC, Morgado RMC. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 1990. vol.3. p.145-78; 211.
- Prista LVN, Alves AC, Morgado RMC. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*. 4.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 1992. vol. 1. p. 485; 532-42.
- Prista LVN, Alves AC, Morgado RMC. *Tecnologia Farmacêutica*. 5.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 1995. vol. 1. p. 138-48.

Prista LVN, Alves AC, Morgado RMC. Tecnologia Farmacêutica. 4.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 1996. vol. 3. p. 1596-665.

Puliafito CA, Baker AS, Haaf J, Foster CS. Infectious Endophthalmitis: review of 36 cases. *Ophthalmology* 1982 Aug; 89 (8): 921-9.

Qarah S, Cunha B. Pseudomonas Aeruginosa Infections. Instant access to the minds of medicine. 2003. Available from: <http://www.emedicine.com/med/byname/pseudomonas-aeruginosa-infections.htm> Acesso em 21 nov. 2003.

Roizenblat J, Inomata S. Contaminação de colírios. *Rev Bras Oftalmol* 1982; 41(5): 55-9.

Rowsey JJ, Newsom DL, Sexton DJ, Harms WK. Endophthalmitis: current approaches. *Ophthalmology* 1982 Sep; 89 (9): 1055-66.

Samaranayake LP, Lamey PJ. Oral Candidosis: 1. Clinicopathological Aspects. *Dent Update* 1988 Jul; 15: 227-31.

Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 171-80.

Sandman ER, Abelson MB. What's in That Medication anyway? Review of *Ophthalmology* [serial online] 2002; 9:01. Available from: <http://www.revophth.com/publish/content/1-6.htm>. Acesso em 01 jul. 2004.

Schaberg DR, Turck M. Doenças causadas por bacilos entéricos Gram-negativos. In: Braunwald et al. *Harrison. Medicina Interna*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. vol.1. p. 543.

Schaefer F, Bruttin O, Zografos L, Guex-Crosier Y. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 842-7.

Schaefer T. Cirurgia de catarata. Disponível em: http://www.schaefer.com.br/cirurgia_de_catarata.html. Acesso em 26 nov. 2003.

Schein OD, Glynn RJ, Poggio EC, Seddon JM, Kenyon KR. The relative risk of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. *N Engl J Med* 1989; 321(12):772-8.

Schein OD, Hibberd PL, Starck T, Baker AS, Kenyon KR. Microbial Contamination Of In-Use Ocular Medications. *Arch Ophthalmol* 1992 Jan; 110: 82-5.

Schein OD, Wasson PJ, Boruchoff A, Kenyon KR. Microbial Keratitis Associated With Contaminated Ocular Medications. *American Journal of Ophthalmology* 1988 Apr; 105 (4): 361-5.

Schellini AS, Silva MRBM, Gonçalves MRCB, Corrêa CR. Contaminação de Colírios Usados em Ambiente Cirúrgico. *Jornal Brasileiro de Medicina* 2000 mai; 78 (5): 10-6.

Seewoodhary R, Stevens S. Transmission and Control of Infection in Ophthalmic Practice. *Community Eye Health* 1999; 12 (30): 25-8.

Sharma SS, Gopalakrishnan S, Aasuri MK, Garg P, Rao GN. Trends in Contact Lens-associated Microbial Keratitis in Southern India. *Ophthalmology* 2003; 110 (1): 138-43.

Shinohara YT, Tasker SA. Successful Use of Boric Acid to Control Azole-Refractory *Candida* Vaginitis in a Woman With AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 1997; 16 (3): 219-20.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela; 1987, 295p.

Silva P. *Farmacologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1985. p. 1187.

Silva RAD. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Edição Oficial; 1926. p. 26-7; 812-3.

Slack RWT. A study of three preparations in the treatment of otitis externa. *J Laryngol Otol* 1987; 101: 533-5.

Small D, Dais M, Wong M, Tang-Liu D. Influence of pH and buffer concentration on the ocular bioavailability of ophthalmic AGN 191103 formulations in albino rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 1997; 149: 195-201.

Smulders C, Brink H, Wanten G, Weers-Pothoff G, Vandenbroucke-Grauls C. Conjunctival and corneal colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. A prospective study. *The Netherlands Journal of Medicine* 1999; 55: 106-9.

Sobel JD, Chaim W. Treatment of *Torulopsis glabrata* Vaginitis: Retrospective Review of Boric Acid Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24: 649-52.

Sobel JD, Chaim W, Nagappan V, Leaman D. Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucytosine. *Am J Obstetrics and Gynecology*. 2003 Nov; 189 (5): 1297-300.

Speaker MG, Milch FA, Shah MK, Eisner W, Kreiswirth BN. Role of External Bacterial Flora in the Pathogenesis of Acute Postoperative Endophthalmitis. *Ophthalmology* 1991; 98: 639-49.

Stratton CW, Tausk F. Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 1989; 42: 275-86.

Swate TE, Weed JC. Boric Acid Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Obstetrics and Gynecology* 1974 Jun; 43 (6): 893-5.

The Columbia Encyclopedia. 6thed. New York: Columbia University Press; 2001. Available from: <http://www.bartleby.com/65/bo/boricaci.html>. Acesso em 18 nov.2003.

The Japanese Pharmacopoeia. 14thed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia; 2001.1357p.

The United States Pharmacopeia. 25thed. rev. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention; 2002. 2569 p.

Thomas PA. Mycotic keratitis-an underestimated mycosis. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 235-56.

Toledo MRF, Trabulsi LR. Pseudomonas. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeia JAN. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 269-70.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000.

Trabulsi LR, Souza CP. Patogenicidade Bacteriana. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeia JAN. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p.143.

Ueda SMY, Fernandes AT. Fungos. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N. *Infecção Hospitalar e suas Interfaces na área da Saúde*. São Paulo: Atheneu; 2000. vol. 1. p. 418-24.

Van Slyke KK, Michel VP, Rein MF. Treatment of vulvovaginal candidiasis with boric acid powder. *Am J Obstet Gynecol* 1981 Sep; 15: 145-8.

Velasco J, Bermudez J. Comparative Study of the Microbial Flora on Contact Lenses, in Lens Cases, and in Maintenance Liquids. *ICLC* 1996 Mar/Apr; 23: 55-8.

Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1052; 1072.

Watanabe T, Fujita T, Sakamoto M, Aono W. Antimicrobial properties of the products from the reaction of various aminoalcohols and boric anhydride. *Materials Chemistry and Physics* 1988; 19: 191-5.

Watson PG, Duerden BI. Laboratory assessment of physical and chemical methods of preserving urine specimens. *J Clin Pathol* 1977; 30: 532-6.

Watson RR, Reyes MA, McMurray DN. Influence of Malnutrition on the Concentration of IgA, Lysozyme, Amylase, and Aminopeptidase in Children's Tears. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978; 157: 215-9.

Welch RB. Samuel Theobald M.D. Ophthalmology at the Johns Hopkins Hospital before the Wilmer Institute 1889-1925 [Abstract]. *Doc Ophthalmol* 1997; 93(1-2): 81-94.

Williams PA, Worsey MJ. Ubiquity of Plasmids in Coding for Toluene and Xylene Metabolism in Soil Bacteria: Evidence for the Existence of New TOL Plasmids. *J Bacteriol* 1976; 125 (3): 818-28.

Wilson LA. To preserve or not to preserve, is that the question? [Editorials] Br J Ophthalmol 1996; 80: 583-4.

Wood M. Conjunctivitis: Diagnosis and Management. Community Eye Health 1999; 12 (30): 19-20.

Xu YY, Samaranayake LP. Oral *Candida albicans* Biotypes In Chinese Patients With And Without Oral Candidosis. Archs Oral Biol 1995; 40 (6): 577-9.

Yasunaga S, Kean EH. Effect of three ophthalmic solutions on chemical conjunctivitis in the neonate. Am J Dis Child 1977 Feb; 131: 159-61.

ANEXO 1

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

ÁGAR CASEÍNA SOJA

Digesto pancreático de caseína	15,0 g
Digesto papaínico de farinha de soja	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $7,3 \pm 0,2$ (F. BRAS. IV, 1988)	

ÁGAR CETRIMIDA

Digesto pancreático de gelatina	20,0 g
Cloreto de magnésio	1,4 g
Sulfato de potássio	10,0 g
Brometo de cetrimônio	0,3 g
Glicerol	10,0 ml
Ágar	13,6 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $7,2 \pm 0,2$ (F. BRAS. IV, 1988)	

ÁGAR NUTRIENTE

Extrato de carne	1,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Peptona	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $7,4 \pm 0,2$ (FABRICANTE: OXOID)	

ÁGAR MAC CONKEY

Digesto pancreático de gelatina	17,0 g
Digesto pancreático de caseína	1,5 g
Digesto péptico de tecido animal	1,5 g
Lactose	10,0 g
Mistura de sais biliares	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho neutro	30 mg
Cloreto de metilrosanilínio	1 mg
Ágar	13,5 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $7,1 \pm 0,2$ (F. BRAS. IV, 1988)	

ÁGAR SABOURAND-DEXTROSE

Dextrose	40 g
Mistura de partes iguais de caseína tratada por suco pancreático e digesto péptico de tecido animal	10 g
Ágar	15 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $5,6 \pm 0,2$ (F. BRAS. IV, 1988)	

ÁGAR VERDE BRILHANTE

Extrato de levedura	3,0 g
Digesto péptico de tecido animal	5,0 g
Digesto pancreático de caseína	5,0 g
Lactose	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Sacarose	10,0 g
Verde brilhante	12,5g
Vermelho de fenol	80 mg
Ágar	20,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $6,9 \pm 0,2$ (F. BRAS. IV, 1988)	

ÁGAR VOGEL JOHNSON

Digesto pancreático de caseína	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
D-manitol	10,0 g
Fosfato de potássio dibásico	5,0 g
Cloreto de lítio	5,0 g
Glicina	10,0 g
Vermelho de fenol	25,0 mg
Ágar	16,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $7,2 \pm 0,2$ (F. BRAS. IV, 1988)	

CALDO CASEÍNA DE SOJA

Caseína tratada por suco pancreático	17,0 g
Farinha de soja por digestão papaínica	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $7,3 \pm 0,2$ (F. BRAS. IV, 1988)	

CALDO DE ENRIQUECIMENTO

Digesto pancreático de tecido animal.	5,0 g
Extrato de levedura	1,5 g
Extrato de carne	1,5 g
Cloreto de sódio	3,5 g
Dextrose	1,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $8,0 \pm 0,1$	
(F. BRAS. IV, 1988)	

CALDO LETHEEN

Peptona de proteosa	10,0 g
Extrato de caldo bovino	5,0 g
Lecitina	0,7 g
Polisorbato 80	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: $7,0 \pm 0,2$	
(FABRICANTE: DIFCO)	

ANEXO 2

ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DOS PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO APLICADOS À POPULAÇÃO (n = 115)

SEXO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Masculino	56	48,70
Feminino	59	51,30
Total	115	100,00

NATURALIDADE	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Paraná	90	78,26
Rio Grande do Sul	2	1,74
Santa Catarina	11	9,57
São Paulo	10	8,69
Rio de Janeiro	1	0,87
Pernambuco	1	0,87
Total	115	100,00

FAIXA ETÁRIA (ANOS)	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Até 20	15	13,04
21 – 30	34	29,57
31 – 40	23	20,00
41 – 50	22	19,13
Acima de 50	21	18,26
Total	115	100,00

GRAU DE ESCOLARIDADE	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
1º. grau incompleto	4	3,48
1o. grau completo	17	14,78
2o. grau incompleto	9	7,83
2o. grau completo	25	21,74
Superior incompleto	29	25,22
Superior completo	29	25,22
Outro	2	1,74
Total	115	100,00

CONHECE ÁGUA BORICADA?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Sim	96	83,48
Não	19	16,52
Total	115	100,00

SABE PARA QUÊ É USADA?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Sim	89	92,71
Não	7	7,29
Total	96	100,00

PARA QUE É USADA	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Conjuntivite	18	20,22
Limpeza dos olhos	15	16,85
Antisséptico	12	13,48
Limpeza das lentes de contato	9	10,11
Limpeza de ferimentos	8	8,99
Limpeza dos olhos e limpeza de ferimentos	7	7,87
Antisséptico e limpeza de ferimentos	3	3,37
Limpeza dos olhos e limpeza das lentes de contato	2	2,25
Limpeza de seios e conjuntivite	2	2,25
Limpeza dos olhos e limpeza dos seios	2	2,25
Limpeza de lentes de contato e conjuntivite	2	2,25
Limpeza dos olhos e pós-cirúrgico	2	2,25
Alergia	1	1,12
Antisséptico e limpeza dos olhos	1	1,12
Limpeza das lentes de contato e limpeza de ferimentos	1	1,12
Limpeza dos seios, limpeza de ferimentos e pós-cirúrgico	1	1,12
Limpeza de ferimentos e conjuntivite	1	1,12
Antisséptico, limpeza dos olhos e limpeza de ferimentos	1	1,12
Antisséptico, limpeza dos olhos e limpeza de lentes de contato	1	1,12
Total	89	100,00

JÁ UTILIZOU?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Sim	66	74,16
Não	23	25,84
Total	89	100,00

PARA QUE UTILIZOU?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Limpeza dos olhos	17	25,76
Limpeza das lentes de contato	5	7,58
Limpeza dos seios	2	3,03
Limpeza de ferimentos	11	16,67
Cicatrização de ferimentos	2	3,03
Conjuntivite	19	28,79
Alergia	2	3,03
Pós-cirúrgico	1	1,52
Limpeza dos olhos e Limpeza dos seios	2	3,03
Limpeza dos olhos, limpeza de ferimentos e pós-cirúrgico	1	1,52
Limpeza dos olhos e limpeza de ferimentos	2	3,03
Limpeza dos olhos e outro	1	1,52
Limpeza das lentes de contato e conjuntivite	1	1,52
Total	66	100,00

FORMA DE UTILIZAÇÃO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Compressa	10	15,15
Lavagem	51	77,27
Compressa e lavagem	5	7,58
Total	66	100,00

LOCAL DE APLICAÇÃO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Olhos	39	59,09
Ferimentos	13	19,70
Lentes de contato	5	7,58
Seios	2	3,03
Olhos e seios	2	3,03
Olhos e ferimentos	3	4,55
Olhos e Piercing	1	1,51
Olhos e lentes de contato	1	1,51
Total	66	100,00

QUEM INDICOU ?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Farmácia	13	19,70
Médico	28	42,42
Parente	18	27,27
Outro	7	10,61
Total	66	100,00

OBTEVE O RESULTADO ESPERADO?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Sim	53	80,30
Não	8	12,12
Não sabe	5	7,58
Total	66	100,00

ANEXO 3

ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DOS PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO APLICADOS NAS FARMÁCIAS E DROGARIAS (n = 84)

CARACTERIZAÇÃO DO ESTABELECIMENTO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Individualizado	48	57,14
Permissionário	11	13,10
Unidade de rede	25	29,76
Total	84	100,00

VENDE ÁGUA BORICADA?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Sim	83	98,81
Não	1	1,19
Total	84	100,00

COMPRA SEMPRE DA MESMA MARCA?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
1,00000	25	30,12
2,00000	58	69,88
Total	83	100,00

MOTIVO	COMPRA SEMPRE DA MESMA MARCA		NÃO COMPRA SEMPRE DA MESMA MARCA	
	Frequência	Percentual	Frequência	Percentual
Preço	2	8,00	45	77,59
Confiabilidade/qualidade	19	76,00	-	-
Disponibilidade de mercado	-	-	10	17,24
Departamento de compras	3	12,00	-	-
Preço/confiab/qualidade	1	4,00	-	-
Opção para o cliente	-	-	3	5,17
Total	25	100,00	58	100,00

MOTIVO	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Preço	47	56,63
Confiabilidade/qualidade	19	22,89
Disponibilidade de mercado	10	12,05
Departamento de compras	3	3,61
Preço/confiab/qualidade	1	1,21
Opção para o cliente	3	3,61
Total	83	100,00

COMO SE DÁ A VENDA?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Indicação	11	13,25
Receita médica	30	36,14
A pedido	36	43,37
Todos os anteriores	5	6,02
Indicação e a pedido	1	1,31
Total	83	100,00

ALGUM FATOR INFLUENCIA NA VENDA DO PRODUTO?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Ação terapêutica	41	49,40
Baixo preço	10	12,05
Ação terapêutica e baixo preço	2	2,41
Nenhum	30	36,14
Total	83	100,00

QUEM RESPONDEU O QUESTIONÁRIO?	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
Farmacêutico	21	25,00
Atendente	49	58,33
Proprietário	13	15,48
Farmacêutico e proprietário	1	1,19
Total	84	100,00